



# Développement et homéostasie lymphocytaire T ab : quels rôles pour l'interleukine-7 ?

Nabil Bosco

## ► To cite this version:

Nabil Bosco. Développement et homéostasie lymphocytaire T ab : quels rôles pour l'interleukine-7 ?. Immunologie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00284832

**HAL Id: tel-00284832**

**<https://theses.hal.science/tel-00284832>**

Submitted on 3 Jun 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Thèse de doctorat de l'Université Joseph Fourier-Grenoble I**  
**UFR de Biologie**

Pour obtenir le titre de  
**Docteur de l'Université Joseph Fourier**

**Par Mohamed Nabil BOSCO**

---

**Développement et homéostasie lymphocytaire  $T\alpha\beta$  :**  
**quels rôles pour l'interleukine-7 ?**

---

Soutenue le 9 Novembre 2005 devant le jury d'examen composé de:

Examineurs :

Dr. Naomi **TAYLOR**  
Dr. Rhodri **CEREDIG**  
Pr. Stephan **NONCHEV**

Rapporteurs :

Dr. Hugh Robson **MACDONALD**  
Dr. Olivier **LANTZ**

INSERM U548  
Département de Réponse et Dynamique Cellulaire  
CEA-Grenoble  
Université Joseph Fourier

# Remerciements

*Finally voilà venu cette dernière page. On ne pense même pas à Elle en débutant son travail de thèse, ensuite on l'attend avec impatience aux premières lignes, aux premières pauses ou à la fin d'une semaine d'écriture difficile d'un manuscrit, puis on se dit « Déjà ! ... Et après ??? ». C'est un peu comme la fin d'un conte, on la connaît. Et, ce n'est qu'une fois de plus une première page qui annonce le début d'une autre aventure. L'heure est donc venue de remercier les personnes qui ont œuvré à la concrétisation de ces travaux. Grâce au soutien de XXX personnes, cette dernière ligne droite à Grenoble était sympa quand même. J'espère que ce sera encore plus fort ailleurs.*

*Mes remerciements vont tout d'abord à Rod, il aura été pour moi bien plus qu'un mentor durant mon adolescence de scientifique. J'ai apprécié sa direction adaptée et intelligente. Il m'a accepté comme un étudiant, bientôt comme un collègue de paillasse, mais je le considère maintenant surtout comme mon premier ami gallois.*

*Je voudrais remercier également les docteurs Naomi Taylor, Olivier Lantz, H. Robson MacDonald et le professeur Stephan Nonchev, pour l'intérêt qu'ils auront porté à ce travail et pour avoir accepté de composer le jury de cette thèse.*

*Comme certains ne souhaitent pas être cités et comme je pourrais aussi malheureusement en oublier d'autres, je dirai simplement un grand merci à ICH. A Patrice Marche pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, aux autres scientifiques, personnels techniques ou administratifs du CEA mais aussi confrères et consœurs de thèse pour avoir contribué de près ou de loin à ce travail. Je remercie toutes les personnes qui m'ont fait généreusement don de leur temps, de leur connaissance ou simplement d'un sourire sincère.*

*J'aurais beaucoup appris à travers mes erreurs à la paillasse et surtout ailleurs, j'ai retenu que souvent des excuses sont bien plus importantes qu'un merci. Je voudrais donc au même titre qu'un sincère merci, adresser un grand pardon aux personnes qui comptent le plus et bien évidemment les membres proches de ma famille pour les moments difficiles ou drôles que je n'aurais pas pu partager avec eux ; y'avait toujours « une ou deux souris à surveiller ;- ) ». Désolé ! Je vous aime, et je serai éternellement reconnaissant pour votre amour et soutien au quotidien.*

**Nabil**



# Principales abréviations

<b>Ac</b>	Anticorps
<b>Ag</b>	Antigène
<b>BCR</b>	Récepteur des cellules B
<b>CFSE</b>	5,6-carboxyfluoresceïne diacétate succinimidyl ester
<b>CLP</b>	Progéniteur lymphoïde commun
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CPA</b>	Cellule présentatrice de l'antigène
<b>DC</b>	Cellule dendritique
<b>DN</b>	Thymocyte double négatif
<b>DP</b>	Thymocyte double positif
<b>FT</b>	Facteur de transcription
<b>HSV</b>	Virus Herpes-simplex
<b>HU</b>	Hydroxy-urée
<b>IL-7</b>	Interleukine-7
<b>LyB</b>	Lymphocyte B
<b>LyT</b>	Lymphocyte T
<b>NK</b>	Cellule natural killer
<b>NK-T</b>	Lymphocyte T non conventionnel NK+
<b>p-Ag</b>	Peptide antigénique
<b>PIL</b>	Prolifération induite par lymphopénie
<b>RTE</b>	Emigrant récent du thymus
<b>Sag</b>	Superantigène
<b>SP</b>	Thymocyte simple positif
<b>TCR</b>	Récepteur des cellules T
<b>Tg</b>	Transgénique
<b>TREC</b>	Cercle d'excision de cellules T
<b>Treg</b>	Lymphocyte T régulateur



# Sommaire

**Avant-propos..... page 8**

**Chapitre 1 : Introduction..... page 9**

**Partie 1 : Généralités sur les lymphocytes  $T\alpha\beta$ ..... page 11**

1. Fonctions et origine
2. Structure du TCR et du complexe CMH-pAg
  - a. Le complexe TCR
  - b. Le complexe CMH-pAg

**Partie 2 : Différenciation thymique des lymphocytes  $T\alpha\beta$ ..... page 17**

1. Le thymus : rôle et organisation
2. Principales caractéristiques cellulaires et moléculaires de la thymopoïèse
  - a. Le stade DN
  - b. L'engagement vers la lignée T, avant ou pendant le stade DN ?
  - c. Le stade DP et passage au stade SP
  - d. Les thymocytes matures  $CD4^+$  ou  $CD8^+$
3. Les étapes de sélection thymique
  - a. La sélection  $\beta$  ou le rôle du pré-TCR
  - b. Sélection positive et négative
4. Le Choix de lignage  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  : « être ou ne pas être un  $CD4^+$  »

**Partie 3 : IL-7 et différenciation thymique des lymphocytes  $T\alpha$ ..... page 32**

1. Généralités sur l'IL-7
2. Sites de production de l'IL-7 et cellules  $IL-7R\alpha^+$
3. Voie de signalisation médiée par le trio IL-7/IL-7R $\alpha$ - $\gamma$ c
4. Effets de l'IL-7 sur la différenciation thymique : *de la survie au lignage*
  - a. Les premiers résultats
  - b. Les résultats plus récents

**Partie 4 : Homéostasie des populations lymphocytaires  $T\alpha\beta$ ..... page 43**

1. Concept et définition
2. Techniques d'études de la dynamique des populations lymphocytaires T périphériques en l'absence de stimulation antigénique
  - a. Méthode stathmocinétique
  - b. Arrêt de la division cellulaire
  - c. Incorporation de précurseurs de base de l'ADN
  - d. Dilution des TREC
  - e. Etude du cycle cellulaire des lymphocytes T
  - f. Expérience de transfert cellulaire
  - g. Arrêt ou limitation de la production centrale

3. Mise en évidence du contrôle homéostatique des LyT périphériques
4. Déterminants moléculaires de l'homéostasie des LyT $\alpha\beta$ 
  - a. L'interaction TCR/CMH est importante pour les LyT naïfs
  - b. L'interaction TCR/CMH est moins importante pour les LyT mémoires
  - c. Quelle est la nature du peptide présenté aux LyT naïfs par le CMH ?
  - d. Les interleukines sont impliquées dans l'homéostasie des LyT $\alpha\beta$
5. Déterminant cellulaire de l'homéostasie des LyT $\alpha\beta$  : contributions des Treg
  - a. Généralités sur les Treg
  - b. Homéostasie des Treg
  - c. Les Treg influencent l'homéostasie des LyT $\alpha\beta$
6. Peut-on encore parler d'homéostasie ???
7. Conclusions et objectifs de l'étude

## **Chapitre 2 : Résultats..... page 65**

**Article 1** : New insights into the proliferation and differentiation of early thymocytes.

**Article 2** : Effects of increasing IL-7 availability on lymphocytes during and after lymphopenia-induced proliferation.

**Article 3** : In interleukin-7 transgenic mice, increasing B lymphopoiesis increases follicular but not marginal B cell numbers.

**Article 4** : Role of the T cell receptor alpha chain in the development and phenotype of naturally arising CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells.

**Article 5** : Differential expression of G-protein signalling transcripts and in vivo migration of CD4<sup>+</sup> naïve and regulatory T cells.

**Résultats complémentaires** : « Numbers matters : lymphopenia determines homeostatic expansion of regulatory T cells. »

## **Chapitre 3 : Discussion et perspectives.....page 107**

1. IL-7 et thymopoïèse
2. IL-7 et homéostasie
3. Homéostasie et tolérance

**Références bibliographiques ..... page 127**

**Table des illustrations ..... page 137**

**Résumé .....page 138**





# Avant-propos :

L'hématopoïèse définit l'ensemble des processus cellulaires à l'origine des cellules sanguines. De par la diversité fonctionnelle des cellules sanguines (transport gazeux, hémostasie, immunité,...) l'hématopoïèse est un processus physiologique vital. Les cellules du système hématopoïétique peuvent être divisées en quatre lignées : la lignée érythrocytaire qui génère les globules rouges, la lignée mégacaryocytaire qui permet la production de plaquettes, la lignée myéloïde à l'origine des polynucléaires, des monocytes et de certaines cellules dendritiques (DC) et enfin la lignée lymphoïde. La lignée lymphoïde comprend les lymphocytes B, T et NK ainsi que certaines DC. Les lymphocytes B et T sont impliqués dans la réponse immune adaptative grâce à leurs récepteurs de surface qui sont respectivement le récepteur des cellules B (BCR) et le récepteur des cellules T (TCR).

Mon travail de thèse a été réalisé sur des modèles murins, et s'est intéressé aux lymphocytes B et T depuis leur développement précoce jusqu'à leur différenciation et leur survie périphérique. Au cours de la rédaction de cette thèse, j'ai choisi de me concentrer principalement sur l'importance de l'interleukine-7 (IL-7) dans le développement et l'homéostasie des lymphocytes  $T\alpha\beta$ . Ce manuscrit comprend un premier chapitre introductif contenant de brefs rappels sur la biologie des lymphocytes  $T\alpha\beta$ , puis il reprend les données actuelles concernant la différenciation T et le rôle de l'IL-7 dans les différentes étapes du développement lymphocytaire T. Ensuite, j'ai abordé les déterminants moléculaires et cellulaires contrôlant l'homéostasie lymphocytaire  $T\alpha\beta$ . La participation de l'IL-7 dans la dynamique des populations de lymphocytes  $T\alpha\beta$  est traitée en détails ici. Dans le deuxième chapitre, les principaux résultats expérimentaux obtenus au cours de ma thèse ainsi que les articles associés sont présentés. Enfin, dans le troisième chapitre, nous discuterons ces résultats.

# **Chapitre 1 : Introduction**



## Partie 1 : Généralités sur les lymphocytes T $\alpha\beta$

### 1. Fonctions et origine

Les lymphocytes T sont des cellules essentielles à la réponse immune adaptative, ils sont produits dans un organe lymphoïde central, le thymus. Ces cellules du système immunitaire sont capables de reconnaître de manière spécifique les antigènes (Ag) étrangers dans l'organisme hôte. Chez l'adulte, tous les lymphocytes dérivent de cellules souches issues de la moelle osseuse. Il existe deux catégories de lymphocytes : les lymphocytes T (LyT) et les lymphocytes B (LyB). Parmi les LyT, tous n'ont pas la même fonction. Certains sont capables d'interagir avec les LyB et les aider à se différencier et produire des anticorps (Ac) ou encore d'interagir avec les cellules phagocytaires et de participer indirectement à la destruction de pathogènes intracellulaires. Ces LyT sont dits auxiliaires et expriment généralement le corécepteur CD4. Leurs actions nécessitent la production de facteurs solubles : les cytokines. Une autre catégorie de LyT est responsable de la destruction directe des cellules hôtes infectées par un virus par exemple ou présentant à sa surface des Ag étrangers. On parle ici de LyT cytotoxiques, ils agissent par interaction directe cellule-cellule et expriment en général le corécepteur CD8. Cependant, il existe des exemples où des cellules CD4<sup>+</sup> ont des propriétés cytotoxiques alors que certaines cellules CD8<sup>+</sup> effectrices agissent par production de cytokines comme les LyT CD4<sup>+</sup> auxiliaires (Pour revue Podack and Kupfer 1991; Seder and Ahmed 2003).

La reconnaissance d'Ag étrangers par les LyT nécessite que les Ag soient présentés à la surface d'une cellule en association avec une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Pour revue (Germain and Jenkins 2004)). Pour cela les LyT utilisent un récepteur spécifique, le TCR (T Cell Receptor), ce récepteur est apparenté en structure et fonctions aux Ac produits par les LyB. Un Ag donné peut être reconnu par plusieurs TCR différents, le système immunitaire d'un individu contient une diversité importante de TCR différents pour potentiellement reconnaître l'ensemble des Ag étrangers. On estime qu'il y'a approximativement 100 millions de LyT chez la souris apportant environ 2 millions de combinaisons TCR $\alpha\beta$ . Chaque clone est représenté par une ou quelques dizaines de cellules dans l'organisme (Casrouge, Beaudoin et al. 2000).

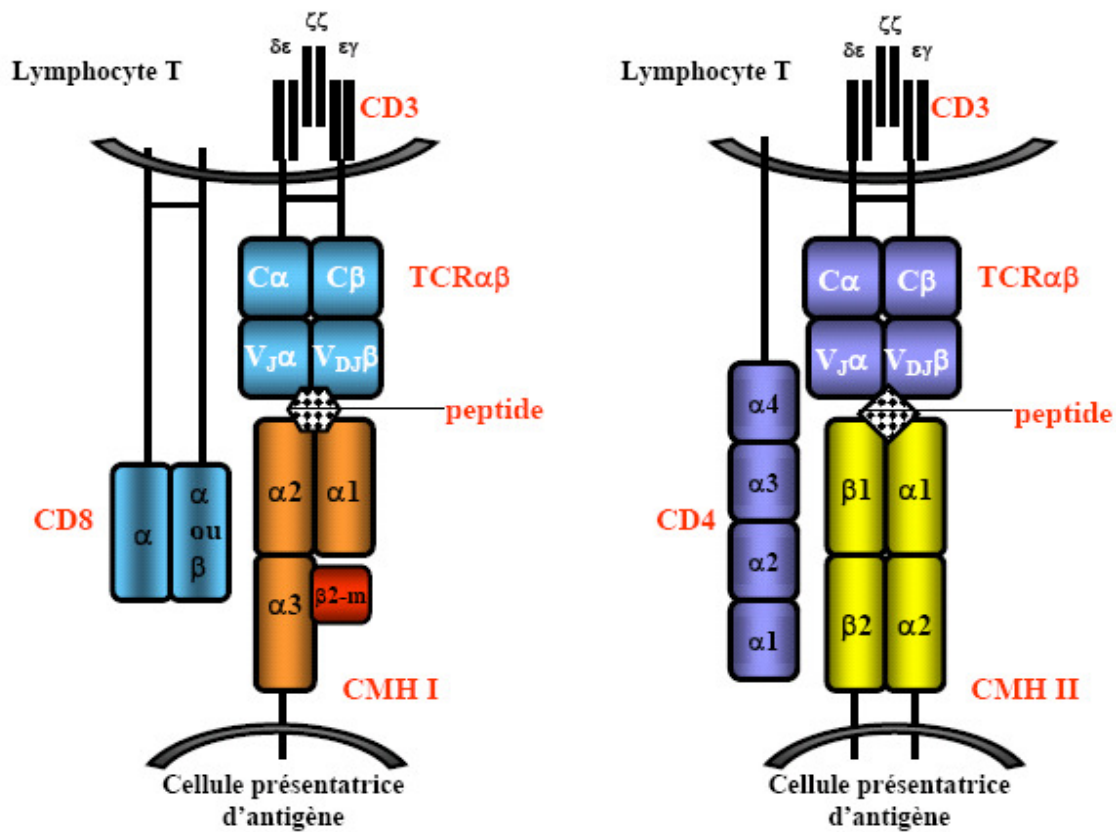
Le TCR selon sa spécificité reconnaît un fragment peptidique présenté par une molécule de CMH de classe I (CMH I) ou de classe II (CMH II). Lors de cette reconnaissance, le TCR entre en contact à la fois avec le peptide présenté et le CMH. L'interaction entre le TCR et le complexe CMH-peptide (CMH-pAg) est assistée par les corécepteurs CD4 ou CD8 associés à la surface des LyT. Les corécepteurs stabilisent l'interaction TCR/CMH-pAg et participent à l'activation des LyT. L'interaction TCR/CMH-pAg avec un CMH I implique un LyT CD8<sup>+</sup> et l'interaction TCR/CMH-pAg avec un CMH II implique un LyT CD4<sup>+</sup> (Pour revue Germain and Jenkins 2004).

## 2. Structure du TCR et du complexe CMH-pAg

Lors de la reconnaissance spécifique d'un Ag par un LyT, différents composants interviennent : le complexe TCR présent à la surface du LyT et le complexe CMH-pAg exprimé à la surface d'une autre cellule dite présentatrice. Ces deux complexes ont des structures particulières présentées ci-dessous et dans la figure 1.1.

### *a. Le complexe TCR*

Le TCR est composé de deux glycoprotéines transmembranaires  $\alpha$  et  $\beta$  associées en hétérodimère. La partie extracellulaire de ces protéines comporte 2 domaines structuraux apparentés aux régions variables (V) et constantes (C) des immunoglobulines (Ig). En plus de son rôle de reconnaissance, le TCR $\alpha\beta$  est aussi un récepteur de signalisation. Cette dernière fonction est assurée par les autres glycoprotéines associées au TCR $\alpha\beta$  : les molécules de signalisation CD3 et le corécepteur CD4 ou CD8. Cet ensemble forme le complexe TCR. Le composant CD3 est constitué de 6 protéines invariantes : 2 CD3 $\zeta$ , 2 CD3 $\epsilon$ , 1 CD3 $\delta$  et 1 CD3 $\gamma$ . Chacune de ces protéines contient au moins un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) responsable de la transduction du signal basée sur des phosphorylations/déphosphorylations qui induisent une cascade de signalisation à l'origine de la réponse du LyT (Pour revue Call and Wucherpfennig 2005). Les corécepteurs CD4 et CD8 se lient avec les molécules CMH II et I respectivement. Ils jouent principalement un rôle dans la signalisation intracellulaire. Ces corécepteurs sont composés de domaines de type immunoglobuline (Ig). CD4 est composé de 4 domaines de type Ig regroupés dans une chaîne. CD8 est composé de 2 chaînes associées en homodimère  $\alpha\alpha$  ou en un hétérodimère  $\alpha\beta$ . Chaque chaîne contient un domaine de type Ig (Cf figure 1.1).



**Figure 1.1 :** Représentation schématique des complexes TCR/CMH-pAg sur les CPA et les LyT CD4<sup>+</sup> à droite ou les CPA et les LyT CD8<sup>+</sup> à gauche.

De manière similaire aux Ig, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR comprennent des régions V et C. Les régions V sont codées par de multiples segments de gènes qui forment le transcrite codant à la suite de recombinaisons somatiques. Ces réarrangements ont lieu dans le thymus durant les étapes de différenciation des LyT. La région V de la chaîne  $\beta$  du TCR est codée par 3 segments de gènes différents : TCRBV (BV), TCRBD (BD) et TCRBJ (BJ). Pour la région V de la chaîne  $\alpha$ , seuls deux segments interviennent : TCRAV (ADV) et TCRAJ (AJ). La grande diversité des TCR résulte de la diversité des segments qu'il est possible de réarranger mais surtout de la nature imprécise des jonctions de ces gènes et de l'ajout de nucléotides dits N et P au niveau de ces jonctions au cours des mécanismes de recombinaison dits V(D)J. Chez la souris on compte 30 segments BV, 2 segments BD et 14 segments BJ pour générer la chaîne  $\beta$  ; 23 segments ADV et 61 segments AJ pour la chaîne  $\alpha$ . A l'exception de quelques pseudogènes, la plupart de ces segments sont réarrangeables. On estime que  $10^{15}$  récepteurs

différents peuvent être générés, on parle de répertoire TCR $\alpha\beta$  potentiel (Casrouge, Beaudoin et al. 2000). Cependant, il semble de plus en plus évident que ceci est une surestimation. En effet, tous les réarrangements V(D)J ne sont pas possibles. Il existe un contrôle spatial et temporel de l'accessibilité des loci TCRA et TCRB, de même que toutes les associations  $\alpha\beta$  ne sont pas possibles (pour revue Krangel 2003). Encore une fois, par analogie aux Ig, les TCR possèdent aussi des régions CDR1, 2 et 3 (Complementary Determining Region). En règle générale, les régions CDR1 et 2 entrent en contact avec le CMH tandis que la région CDR3, issue de la jonction V-J ou V-D-J pour la chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$  respectivement, représente un point de contact direct avec le peptide associé au complexe CMH-pAg. Cependant, des travaux de cristallographie ont montré que les régions CDR1 $\alpha$  et  $\beta$  pouvaient aussi interagir avec le peptide présenté (Garcia, Teyton et al. 1999; Garcia and Adams 2005).

#### *b. Le complexe CMH-pAg*

Les molécules du CMH sont des glycoprotéines polymorphiques présentes à la surface des cellules sous deux grandes formes : CMH I (H-2D, L et K) et CMH II (I-A et I-E). Les gènes qui codent pour ces molécules sont exprimés de manière codominante. Par contre les molécules de CMH ne sont pas exprimées de la même façon à la surface des différentes cellules de l'organisme. Les molécules de CMH I sont présentes à la surface de pratiquement toutes les cellules de l'organisme alors que les molécules CMH II ont une distribution limitée principalement aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du système immunitaire. C'est à dire les cellules dendritiques (DC), les macrophages et les LyB. Certaines autres cellules comme les cellules épithéliales peuvent exprimer les molécules de CMH II de manière inductible et interféron-dépendante (pour revue Ting and Baldwin 1993; Boss 1997).

Les molécules CMH I et CMH II sont hétérodimériques (Cf figure 1.1). Les molécules de CMH I sont constituées d'une chaîne lourde ou  $\alpha$  associée à une chaîne légère de  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2-m). La chaîne  $\alpha$  comporte 3 domaines  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 3. Le peptide porté par le CMH I se niche dans une cavité structurale délimitée par les chaînes  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 (pour revue Werlen, Hausmann et al. 2003). La stabilisation du peptide dans le complexe CMH I nécessite l'association des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ 2-m. En effet chez les souris  $\beta$ 2-m<sup>-/-</sup> (Koller, Marrack et al. 1990; Perarnau, Siegrist et al. 1990), on observe un défaut de présentation au niveau du



CMH I, entraînant un défaut de différenciation thymique des LyT CD8<sup>+</sup>. Les molécules de CMH II sont composées de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  comprenant chacune deux domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  ou  $\beta 1$  et  $\beta 2$  avec des longueurs sensiblement identiques. Le peptide porté par le CMH II se niche dans une cavité structurale délimitée par les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  entre les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  (pour revue Werlen, Hausmann et al. 2003). C'est pourquoi il suffit de l'absence de l'une des chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  pour entraîner un défaut de présentation par les molécules CMH II.

Les peptides qui sont dérivés de l'Ag et qui se lient aux molécules de CMH I ou II sont de natures différentes.

♦ La plupart des peptides associés au CMH I sont issus de la dégradation de protéines du cytoplasme par le protéasome. C'est pourquoi on parle de la voie de présentation endogène ou cytosolique. Les molécules de CMH I sont assemblées dans le réticulum endoplasmique (RE) où elles vont se lier à des peptides d'environ 8 à 10 acides aminés pour stabiliser leurs structures. Cette association nécessite des protéines de transport des peptides du cytoplasme vers le RE : les protéines TAP (Transporter Associated with antigen Processing activity). Ainsi, dans les animaux TAP<sup>-/-</sup> (Aldrich, Ljunggren et al. 1994) on observe un défaut d'expression de CMH I.

♦ On retrouve souvent au niveau du CMH II des peptides issus d'Ag exogènes endocytés. On parle cette fois de la voie de présentation endosomale. Après endocytose, ces Ag sont dégradés par le système endosome/lysosome où a lieu l'assemblage des molécules de CMH II. Des peptides d'environ 14-17 acides aminés sont générés et s'associent sur place au CMH II pour créer les complexes CMH-pAg. Une protéine appelée chaîne invariante (Ii) empêche le chargement de peptides endogènes au niveau du RE et de l'appareil de Golgi sur les molécules de CMH II. Cela permet de séparer de manière efficace les voies de présentation de CMH I et II. Cette fonction de séparation est principalement assurée par le segment CLIP (Class II associated Ii chain Peptide) qui est le résidu 81-104 du produit de digestion de Ii par les cathepsines. CLIP s'associe à la niche à peptide des molécules de CMH II et inhibe leurs

liaisons à d'autres peptides jusqu'à son élimination dans les endosomes (Lotteau, Teyton et al. 1990; Teyton, O'Sullivan et al. 1990; Ghosh, Amaya et al. 1995).

Il est important de noter qu'il existe certaines exceptions à ces règles de présentation, certains peptides exogènes peuvent être chargés sur des molécules de CMH I, on parle de présentation croisée (Pour revue Heath, Belz et al. 2004). De plus, tous les peptides générés et présentés ne sont pas forcément immunogènes. En effet, un peptide immunogène doit se lier à une molécule de CMH et doit créer une affinité suffisante entre les complexes CMH-pAg et les TCR spécifiques de ce complexe pour déclencher l'activation et la prolifération du LyT.

## **Partie 2 : Différenciation thymique des lymphocytes T $\alpha\beta$**

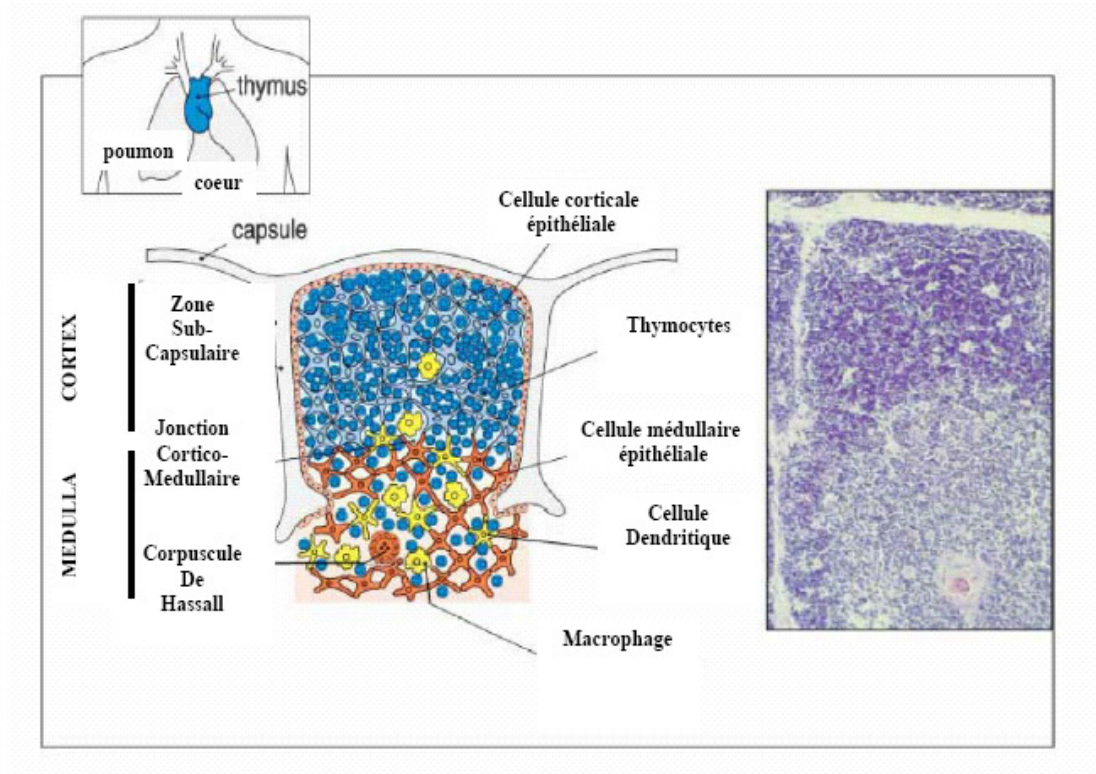
Les LyT sont générés dans le thymus à partir de la différenciation de précurseurs ayant pour origine le foie fœtal ou plus tard chez l'adulte la moelle osseuse. Chez l'adulte, les précurseurs rejoignent le thymus par la voie sanguine (Pour revue Anderson and Jenkinson 2001; Ceredig and Rolink 2002; Gill, Malin et al. 2003). La maturation intrathymique est marquée par une succession de stades de différenciation. Les thymocytes immatures CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, désignés double négatifs (DN) se différencient en thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, désignés double positifs (DP) puis en thymocytes matures CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, désignés simple positif (SP). La progression de la maturation des thymocytes est soumise à différents points de contrôles dépendants notamment de l'expression des gènes codant pour les chaînes du TCR ou de la voie de signalisation en aval du récepteur à l'IL-7. L'expression des gènes du TCR est régulée au cours du développement et est en partie impliquée dans la divergence des lignées lymphocytaire T  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ . Dans cette partie, nous décrirons dans un premier temps l'organisation du thymus puis les principaux événements cellulaires et moléculaires assurant la différenciation des lymphocytes T  $\alpha\beta$  au sein du thymus – thymopoïèse –. Nous détaillerons les rôles de l'interleukine-7 (IL-7) dans la thymopoïèse dans la partie suivante du manuscrit.

### **1. Le thymus : rôle et organisation**

C'est le lieu majeur de la production de LyT tout au long de la vie adulte. Les précurseurs des LyT colonisent le thymus dès la vie fœtale pour subir les étapes de différenciation qui aboutiront à la génération de cellules T matures. Le développement des LyT matures et fonctionnels, est autorisé grâce à un environnement cellulaire spécialisé et la présence de facteurs adéquats pour la maturation, la survie et la prolifération des précurseurs. Historiquement, ce n'est qu'au début des années 60, après les expériences de Miller, que la fonction du thymus et sa participation au système immunitaire par la génération des cellules T seront clairement identifiées (Miller 1961).

Le thymus est un organe composé de deux lobes situé dans la cage thoracique juste au dessus du cœur (Cf figure 1.2). Chez une souris adulte, cet organe contient environ 100-200 millions de cellules. Chaque lobe est constitué d'une multitude de lobules comportant une

région externe, le cortex et une région interne, la médulla. Chez la souris, l'épithélium thymique apparaît au 11<sup>ème</sup> jour de la vie embryonnaire (F11) par fusion de tissu d'origine endodermique et ectodermique. Il est alors colonisé par les premières cellules hématopoïétiques. La composition cellulaire est très différente entre le cortex et la médulla. Le stroma thymique est composé de cellules épithéliales thymiques que l'on retrouve au sein du cortex et de la médulla mais aussi de cellules d'origine hématopoïétique : cellules dendritiques, macrophages ou encore cellules B. Ces dernières ne sont pas distribuées équitablement entre le cortex et la médulla. En effet, celles-ci sont concentrées majoritairement dans la médulla. Cette différence de répartition est à l'origine de compartiments distincts dans le thymus qui assurent des fonctions propres au cours de la maturation des thymocytes (Cf figure 1.2, pour revue Anderson and Jenkinson 2001).



**Figure 1.2 :** Localisation et organisation histologique du thymus.

Cet organe se situe au dessus du cœur. Le thymus est formé d'un ensemble de petits lobules délimités par une capsule. Chaque lobule est constitué de deux régions distinctes, le cortex plus externe et la médulla plus centrale. On distingue clairement ces régions après un marquage à l'hématoxyline-éosine (encart de droite).

L'essentiel des étapes de maturation des thymocytes se déroule au niveau du cortex où on retrouve une concentration importante de thymocytes immatures. Les précurseurs rejoignent le thymus au niveau du cortex par des vaisseaux situés au niveau de la jonction cortico-médullaire. Au cours de leur maturation les thymocytes migrent sous l'influence des chemokines au sein du cortex jusqu'à la région sous-capsulaire, puis en fin de maturation les thymocytes expriment conjointement les corécepteurs CD4 et CD8 (stade DP) et reprennent une migration vers la médulla. Au cours de cette deuxième étape de migration, les thymocytes vont être sélectionnés. Les thymocytes matures et correctement sélectionnés seront retrouvés dans la médulla et exprimeront soit le corécepteur CD4 soit le corécepteur CD8 (stade SP). Ces mouvements migratoires des précurseurs lymphocytaires au cours de la thymopoïèse nécessitent une régulation importante assurée entre autre par l'expression de chémokines particulières (pour revue Prockop and Petrie 2000). A la fin de différenciation, les cellules T matures CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> sont prêtes à quitter le thymus et rejoindre les organes lymphoïdes périphériques par voie sanguine et/ou lymphatique, on parlera d'émigrants thymiques récents (RTE). Entre la colonisation du thymus et la génération de lymphocytes T matures, on estime qu'une période de 3 à 4 semaines est nécessaire chez l'adulte, et un peu moins chez les nouveaux-nés (Scollay and Weissman 1980; Scollay, Butcher et al. 1980). Il est important de noter que de manière réciproque, la différenciation des lymphocytes T est nécessaire à la structuration du thymus. En effet, les blocages de la différenciation thymique provoquent en parallèle une diminution de la cellularité thymique mais aussi des défauts d'organisation du compartiment stromal du thymus (van Ewijk, Hollander et al. 2000).

## **2. Principales caractéristiques cellulaires et moléculaires de la thymopoïèse**

### *a. Le stade DN*

La différenciation des cellules T dans le thymus se compose d'une succession de stades définis par l'expression de marqueurs de surface distincts. Les populations de thymocytes les plus immatures sont les DN. L'expression des marqueurs CD44 et CD25 permet de distinguer quatre sous-populations de DN en cours de différenciation. Ce sont des expériences de recolonisation de lobes thymiques fœtaux déplétés de leurs précurseurs par chacune des sous-populations DN qui ont permis de définir la séquence de différenciation suivante : CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (DN1), CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (DN2), CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (DN3) puis CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>

(DN4) (Godfrey, Kennedy et al. 1993). Le réarrangement de la chaîne du TCR $\beta$  va se dérouler durant ces étapes de maturation et leur expression en surface des thymocytes à travers le pré-TCR puis le TCR va participer à la régulation fine de la différenciation des thymocytes.

Les cellules DN1 sont les cellules les plus immatures. Ces cellules de petite taille ont un phénotype CD117<sup>high</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Leur stade de maturation peu avancé leur permet, en fonction des signaux extracellulaires, de se différencier aussi bien en cellules T qu'en cellules myéloïdes ou NK. Les cellules DN2 sont CD117<sup>High</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Elles sont engagées dans la lignée T et produisent majoritairement des cellules T $\alpha\beta$  et T $\gamma\delta$ . A ce stade, elles peuvent réarranger les gènes codant pour les chaînes D et J du locus  $\beta$ , V, D et J du locus  $\delta$  et V et J du locus  $\gamma$  du TCR. Les cellules DN3 sont CD117<sup>low</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>. A ce stade, les cellules réarrangent majoritairement le locus TCRB et continuent de réarranger les chaînes TCR $\delta$  et TCR $\gamma$  (Tourigny, Mazel et al. 1997; Capone, Hockett et al. 1998; Ceredig and Rolink 2002). Environ 90% des cellules DN3 sont en phase G0/G1 du cycle cellulaire et 10% des cellules sont en phases S, c'est pourquoi il y'a peu de cellules de grosses tailles – blastes –. Ces cellules expriment de manière constitutive la chaîne pT $\alpha$ , le complexe CD3 et la chaîne TCR $\beta$ . Ces trois composants sont nécessaires à la formation du pré-TCR. Une faible proportion des petites cellules exprime la protéine TCR $\beta$  au niveau intracellulaire alors que la majorité des cellules de grosse taille l'exprime. Ces dernières sont dans la transition DN3-DN4. Cette transition est le « théâtre » de la sélection  $\beta$ , qui élimine une partie des cellules n'ayant pas une chaîne TCR $\beta$  correctement réarrangée (Godfrey, Kennedy et al. 1994; Wilson and MacDonald 1995; Hoffman, Passoni et al. 1996; Wilson, Marechal et al. 2001). Les cellules DN4 sont CD117<sup>low</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>. Elles correspondent au dernier stade DN et ont la propriété de proliférer fortement. Lors d'une reconstitution par des cellules DN4 de lobes thymiques déplétés en progéniteurs T, 6 jours suffisent pour détecter des cellules SP CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. L'expression à la surface d'une chaîne TCR $\beta$  associée au complexe pré-TCR n'est détectable qu'à ce stade de différenciation. Entre le stade DN et DP, une population de cellules dites « immature simple positive » (ISP) a été décrite. Ces cellules expriment modérément soit le co-récepteur CD4 soit CD8. Ces cellules commencent à réarranger les gènes codant pour la chaîne TCR $\alpha$ .

*b. L'engagement vers la lignée T, avant ou pendant le stade DN ?*

Très tôt parmi les DN1, une population qui exprimait la molécule CD4 à un faible niveau (CD4<sup>low</sup>) a été identifiée (Wu, Scollay et al. 1991; Michie, Carlyle et al. 1998). Il est admis que cette population de thymocytes DN1 CD4<sup>low</sup> représente les thymocytes les plus précoces. Le transfert de populations triées de DN dans des thymus fœtaux et la culture organotypique de ces thymus (FTOC) a permis de montrer par le passé que les DN1 (sur la base des marqueurs à disposition à l'époque pour isoler ces populations) ont la capacité de générer des cellules T, B, NK et DC (Moore and Zlotnik 1995; Wu, Li et al. 1996). Pour les populations DN2 et DN3 les conclusions divergeaient selon les auteurs, sûrement parce qu'il est difficile de séparer clairement ces deux populations. Moore et Zlotnik ont observé une génération presque exclusive de cellules T à partir de DN2 et ont conclu à un engagement des précurseurs dans la lignée T dès le stade DN2 avant tout réarrangement des gènes TCRB, G et D (Moore and Zlotnik 1995; Wu, Li et al. 1996). Selon Wu et al., les précurseurs DN2 peuvent générer à la fois des DC et des cellules T (Wu, Li et al. 1996). L'engagement définitif dans la lignée T se ferait donc au delà du stade DN2. Il faut cependant noter que dans l'étude de Moore et Zlotnik, la présence de DC n'avait pas été testée. Il semblait donc vraisemblable que l'engagement dans la lignée T se fasse au sein du thymus au cours de la transition DN2-DN3, phase durant laquelle sont initiés les réarrangements des gènes des loci TCRB, G et D.

Depuis peu, le dogme qui voulait que l'engagement dans la lignée T s'opérait au sein du thymus s'est écroulé. En effet sur la base d'une définition plus précise des propriétés phénotypiques des progéniteurs T, une population dite CLP-2 (Martin, Aifantis et al. 2003) puis plusieurs autres types de progéniteurs déjà engagés dans la lignée T avant même de rejoindre le thymus seront décrites (pour revue Pelayo, Welner et al. 2005). On retrouvera ces progéniteurs « T-engagés » dans la moelle, le sang et au sein des DN1. Cet engagement s'effectue avant de coloniser le thymus, il est logique que les DN1 correctement définis ne conservent plus leur capacité à se différencier en cellules B, mais ils conservent leur capacité de différenciation en macrophages, cellules NK ou en DC (Balciunaite, Ceredig et al. 2005).

*c. Le stade DP et passage au stade SP*

Au début du stade DP, la chaîne TCR $\beta$  réarrangée est exprimée à la surface dans le complexe pré-TCR après la sélection  $\beta$ . Le pré-TCR délivre un signal qui stimule le réarrangement des gènes TCRA. Bien qu'au niveau de chaque thymocyte, les deux allèles des gènes TCRB puissent être exprimés, la plupart des thymocytes matures n'expriment qu'une seule chaîne TCR $\beta$  à leur surface. On parle d'exclusion allélique. Au niveau du locus TCRB, l'exclusion allélique intervient au niveau génétique en supprimant la possibilité de réarranger le second locus TCRB si le premier a produit une chaîne TCR $\beta$  fonctionnelle (pour revue Khor and Sleckman 2002).

Pour le réarrangement de la chaîne TCR $\alpha$ , les mécanismes sont différents. Les réarrangements des loci TCRA commencent à la fin du stade DN4 et sont très importants au stade DP (pour revue Fehling and von Boehmer 1997). Ceci induit une population DP TCR $\alpha\beta^{\text{low}}$  de petite taille avec une faible activité de division. Ces cellules seront sujettes à la sélection positive que nous détaillerons plus loin. A cette étape, contrairement à l'expression d'une chaîne  $\beta$  fonctionnelle, l'expression d'une chaîne  $\alpha$  n'entraîne pas de diminution de l'expression des gènes RAG (Wilson, Held et al. 1994). Les réarrangements des gènes TCRA peuvent donc continuer de façon séquentielle sur le même locus ou sur le deuxième locus TCRA. Ainsi, un thymocyte avec une seule chaîne TCR $\beta$  peut exprimer différents TCR $\alpha\beta$  qui peuvent être testés individuellement au cours des étapes de sélection. Les réarrangements continuent jusqu'à que les cellules reçoivent un signal de sélection positive ou meurent (Petrie, Livak et al. 1993; Alam, Crispe et al. 1995). Dans le cas où la cellule reçoit un signal de sélection positif, sa maturation se poursuit, elle devient DP TCR $\alpha\beta^{\text{High}}$ , et n'exprime alors en général plus qu'une seule chaîne TCR $\alpha$ . Au début des réarrangements du locus TCRA, les transcrits des chaînes  $\alpha$  sont instables, leur dégradation est rapide, et l'appariement des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  traduites est limité. Après la signalisation via un TCR fonctionnel à la surface, on observe une augmentation du niveau d'expression d'une chaîne  $\alpha$  donnée et une expression importante du complexe TCR $\alpha\beta$  en surface. Il semblerait qu'il y ait une compétition entre les chaînes  $\alpha$  pour s'associer avec la chaîne  $\beta$ . L'hétérodimère qui répond positivement à la sélection et avec la plus grande affinité sera exprimé (Crispe, Shimonkevitz et al. 1987; Havran, Poenie et al. 1987; Kears, Roberts et al. 1994; Punt, Roberts et al. 1994; Alam, Crispe et al. 1995). Il n'y a donc pas d'exclusion allélique stricte pour le locus TCRA,



et certains lymphocytes T périphériques expriment deux chaînes  $\alpha$  et donc deux TCR différents à leur surface (Padovan, Casorati et al. 1993; Padovan, Giachino et al. 1995; Niederberger, Holmberg et al. 2003). Initialement, on pensait que ces lymphocytes pouvaient être à l'origine de pathologies auto-immunes en assumant que la sélection négative de l'un de leur TCR n'est pas été réalisée correctement (pour revue Padovan, Casorati et al. 1995). Celui-ci pouvant conduire à la reconnaissance d'antigène du soi en périphérie. Cette hypothèse est aujourd'hui abandonnée, et il semble même que l'expression de deux TCR pourrait être un mécanisme d'augmentation de la diversité du répertoire (He, Janeway et al. 2002).

#### *d. Les thymocytes matures $CD4^+$ ou $CD8^+$*

Après l'engagement dans la voie  $CD4^+$  ou  $CD8^+$ , seul le corécepteur correspondant sera exprimé. Les thymocytes SP sont retrouvés dans la médulla. Des travaux ont montré que ces cellules prolifèrent après leur engagement (Ceredig 1990; Hare, Jenkinson et al. 2000). Cette prolifération est importante dans un thymus néonatal et elle reste encore détectable dans un thymus adulte. Durant leur séjour dans la médulla, les cellules SP semblent soumises à un processus de maturation qui conditionnerait leur export vers la périphérie. On retrouve des différences phénotypiques entre les thymocytes SP et les RTE qui ne sont pas équivalents entre les  $CD4^+$  et les  $CD8^+$ . Les RTE  $CD4^+$  expriment des niveaux moins importants de  $\beta 7$ -intégrine, CD45RB que les cellules  $CD8^+$  (Gabor, Godfrey et al. 1997). De plus, des travaux récents utilisant des souris exprimant la GFP comme gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène RAG-2, ont montré que les RTE continuent leur maturation en périphérie (Boursalian, Golob et al. 2004). Dans ce modèle de souris, les auteurs ont pu distinguer les RTE des cellules T naïves en fonction de leur niveau d'expression de GFP. Les RTE sont  $GFP^{High}$  alors que les cellules T naïves sont  $GFP^+$ . Grâce à ce critère distinctif les auteurs ont pu montrer que la différenciation T, d'un point de vue phénotypique et fonctionnelle, s'achève dans les organes lymphoïdes secondaires.

Les lymphocytes T passent donc par différents stades de différenciation thymique incluant des étapes de sélection que nous détaillerons plus bas. Une fois que les deux loci TCRB et TCRA sont réarrangés, l'activité de prolifération des thymocytes sera réduite et une majorité de cellules aura péri. Les cellules matures exportées en périphérie constituent environ 1% des thymocytes générés par jour (pour revue Palmer 2003). Ces cellules

représentent le répertoire T pré-immun global. Il englobe un large spectre de spécificité antigénique qui doit être maintenu en périphérie pour pouvoir répondre au besoin à une variété importante de pathogènes. Ce sont ces mécanismes homéostatiques périphériques que nous aborderons dans la quatrième partie du chapitre introductif de ce manuscrit.

### **3. Les étapes de sélection thymique**

#### *a. La sélection $\beta$ ou le rôle du pré-TCR*

Vu le caractère imprécis de la recombinaison V(D)J, statistiquement seulement 33% des réarrangements conservent une phase ouverte de lecture. Les travaux de Dudley et al. montrent qu'au sein des DN3, seulement 30% des réarrangements des gènes TCRB sont en phase (réarrangement productif). Au stade DN4, on retrouve 75% des réarrangements des gènes TCRB en phase (Dudley, Petrie et al. 1994). Ces résultats impliquent qu'il existe une maturation préférentielle des cellules ayant un réarrangement productif et pouvant exprimer une chaîne TCR $\beta$ . C'est à partir de là que la notion de sélection  $\beta$  est née. Les souris TCR $\beta^{-/-}$  présentent un blocage partiel de différenciation au stade DN3, et indiquent aussi l'importance de l'expression d'une chaîne  $\beta$  fonctionnelle pour la progression du stade DN vers DP (Mombaerts, Clarke et al. 1992). L'introduction d'un transgène TCR $\beta$  fonctionnel dans des souris Rag-2 $^{-/-}$  entraîne lui aussi l'apparition de cellule DP (Shinkai, Koyasu et al. 1993). Ces résultats montrent que l'expression d'une chaîne TCR $\beta$  en l'absence de chaîne TCR $\alpha$  suffit à promouvoir la différenciation du stade DN au stade DP. Comme cela avait été montré avec les immunoglobulines à savoir l'association de la chaîne lourde avec les chaînes V pré-B et  $\lambda 5$ , il sera montré que la chaîne  $\beta$  se lie de manière covalente à une chaîne invariante pT $\alpha$  pour former le complexe pré-TCR à la surface des thymocytes (pour revue Melchers 2005; von Boehmer 2005). L'expression de ce complexe nécessite un réarrangement TCR $\beta$  productif et marque le moment de la sélection  $\beta$ . La détection des transcrits des chaînes pT $\alpha$ , TCR $\beta$  et des différentes molécules de transduction CD3 $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\zeta$  au stade DN3 est un argument appuyant la présence d'un complexe pré-TCR au stade DN3 (Wilson and MacDonald 1995). Les thymocytes sélectionnés pour l'expression d'un pré-TCR progressent vers le stade DN4, prolifèrent et initient ensuite au stade DP massivement les réarrangements des gènes TCRA. Les cellules DN4 comprennent une proportion importante de cellules de plus grandes tailles ou blastes. Ceci caractérise une population importante de cellules en cycle et coïncide avec

une seconde vague d'expression des gènes RAG au cours de la transition vers le stade DP (Wilson, Held et al. 1994).

Chez les souris déficientes pour l'une ou l'autre des chaînes du complexe pré-TCR ( $pT\alpha^{-/-}$ ,  $TCR\beta^{-/-}$  ou  $CD3\epsilon^{-/-}$ ), on observe une réduction importante du nombre total de thymocytes mais un nombre relativement élevé de cellules DN3 (Mombaerts, Clarke et al. 1992; Fehling, Krotkova et al. 1995; Malissen, Gillet et al. 1995). Ceci reflète l'importance de la sélection  $\beta$  pour la différenciation thymique, mais aussi le rôle du pré-TCR dans la prolifération des thymocytes au-delà du stade DN3 et la différenciation jusqu'au stade DP.

Le réarrangement des gènes TCRA semble intervenir essentiellement durant la transition du stade DN au stade DP, après la sélection  $\beta$ . L'expression du pré-TCR est donc importante mais pas essentielle (pour revue von Boehmer 2005). C'est pourquoi chez les souris  $pT\alpha^{-/-}$  (n'exprimant pas de pré-TCR), on observe un blocage partiel de la thymopoïèse autorisant la présence de cellules DP avec un profil de réarrangement des gènes  $TCR\alpha$  normal mais une réduction importante de la cellularité thymique (Fehling, Krotkova et al. 1995). De même, chez les souris  $TCR\beta^{-/-}$  malgré une réduction importante de la cellularité thymique, les thymus contiennent aussi des cellules DP. L'origine de ces cellules DP n'était pas très claire. On sait qu'elles disparaissent lorsque l'on croise les animaux  $TCR\beta^{-/-}$  avec les animaux  $TCR\delta^{-/-}$  (Mombaerts, Clarke et al. 1992). Ce résultat suggère que les chaînes  $\delta$  peuvent assurer en partie la progression des précurseurs thymiques du stade DN au stade DP. Il semblerait même que plusieurs combinaisons de complexes TCR puissent assurer la transition DN-DP, notamment certains  $TCR\alpha\beta$  ou  $TCR\gamma\delta$  déjà associés au stade DN, ou encore des complexes  $TCR\alpha\gamma$  (Erman, Feigenbaum et al. 2002; Erman, Guinter et al. 2004).

Il est important de noter que jusqu'à présent aucun ligand spécifique du pré-TCR n'a été identifié et l'ablation de son domaine extracellulaire n'a pas d'effet sur sa fonction (Irving, Alt et al. 1998). Le pré-TCR transduit vraisemblablement des signaux de manière constitutive comme cela est déjà démontré pour le pré-BCR (Melchers 2005; von Boehmer 2005). L'expression du gène  $pT\alpha$  est importante surtout au stade DN2 et DN3, c'est à dire au moment où des réarrangements massifs des gènes  $TCRB$  sont observés. L'analyse des souris  $pT\alpha^{-/-}$  révèle que le pré-TCR est important dans la sélection  $\beta$ . Dans une souris normale la quasi-totalité des cellules DP sont  $TCR\beta^{+}$  après un marquage intracellulaire. Chez les souris

pT $\alpha^{-/-}$ , il y'a peu de cellule DP et seulement 30-40% d'entre-elles sont TCR $\beta^{+}$  (Buer, Aifantis et al. 1997; Buer, Aifantis et al. 1997; Krotkova, von Boehmer et al. 1997; Michie and Zuniga-Pflucker 2002). La chaîne pT $\alpha$  intervient donc dans un processus actif de sélection des thymocytes immatures possédant un réarrangement TCR $\beta$  en phase.

#### *b. Sélection positive et négative*

A partir du stade DP, le TCR exprimé par les thymocytes immatures est capable d'interagir avec les molécules de CMH exprimées à la surface des cellules épithéliales corticales. Si cette interaction est d'affinité modérée, la cellule sera sélectionnée positivement. Certaines des cellules sélectionnées peuvent avoir un récepteur qui reconnaît des constituants du soi avec une forte affinité. Ces cellules auto-réactives sont éliminées par sélection négative suite à une interaction de leur TCR avec le CMH-pAg présenté par les cellules dérivées de la moelle osseuse au niveau de la jonction cortico-médullaire ou de la médulla (pour revue Anderson and Jenkinson 2001).

La découverte des phénomènes de sélection positive a démarré avec les travaux de M. Bevan et l'utilisation de souris chimères (Bevan 1977; Bevan 1977; Matzinger and Bevan 1977). Au début des années 1970, M. Bevan a cherché à tester l'« hypothèse de Jerne » (Jerne 1973), selon laquelle la genèse de la diversité des récepteurs serait seulement somatique et les molécules H2 chez la souris seraient responsables de cette diversité. Des souris F1 H-2<sup>b</sup>/H-2<sup>d</sup> ont donc été reconstituées après irradiation avec des cellules de la moelle osseuse de la souche parentale H-2<sup>b</sup> ou H-2<sup>d</sup> (Cf tableau 1.1). Les chimères ainsi obtenues répondaient maintenant aux Ag présentés par la souche parentale avec laquelle les souris ont été reconstituées. C'est ainsi qu'on a démontré que les cellules T sont éduquées dans le thymus en imposant une restriction aux molécules de CMH que ces cellules expriment. D'autres groupes ont ensuite confirmé ces travaux et montré l'importance du thymus dans l'éducation des cellules T et l'élimination des cellules T auto-réactives par un mécanisme restreint au CMH (pour revue Zinkernagel 1978).

La présence de deux mécanismes distincts de sélection était pressentie mais ce n'est qu'avec l'utilisation de souris TCR-Tg qu'une démonstration claire a pu être apportée. Ainsi, on a montré que les TCR restreints au CMH I étaient orientés vers la lignée CD8<sup>+</sup> et ceux restreints au CMH II étaient orientés vers la lignée CD4<sup>+</sup> (Sha, Nelson et al. 1988; Sha,

Nelson et al. 1988; Berg, Pullen et al. 1989). L'intervention des molécules du CMH dans la sélection étant claire, il était important de savoir comment, au même stade de développement, une interaction entre le TCR des cellules DP avec un complexe CMH-pAg pouvait entraîner un signal de survie/différenciation (sélection positive) ou un signal de mort cellulaire (sélection négative). On s'est alors penché sur le rôle des peptides dans la sélection thymique. Il a été étudié en utilisant un mutant naturel pour la molécule K<sup>b</sup> de CMH I : le mutant *bm8*. Deux groupes ont travaillé sur cette mutation. Le premier a étudié la réponse contre l'ovalbumine restreinte à K<sup>b</sup> chez les souris *bm8* (Nikolic-Zugic and Bevan 1990) et le second a examiné l'effet de cette mutation sur l'apparition des cellules CD8<sup>+</sup> matures portant un TCR-Tg restreint à K<sup>b</sup> : le TCR 2C (Sha, Nelson et al. 1990). Dans les deux cas, les cellules T spécifiques n'arrivent pas à maturation dans le thymus des souris *bm8*. Par contre cette maturation est restaurée dans les souris F1 portant un allèle K<sup>b</sup> sauvage et un allèle mutant *bm8*. Ceci montrait que le phénotype des souris *bm8* est la conséquence d'une absence de sélection positive et non pas d'un défaut de sélection négative. Une approche similaire a montré l'implication des peptides du soi dans la sélection positive des cellules CD4<sup>+</sup> restreintes au CMH II (Berg, Frank et al. 1990).

<b>Donneur</b> (Moelle osseuse injectée)	<b>Receveur</b> (Souris irradiée et reconstituée)	<b>Spécificité des Lymphocytes T</b>
<b>(H-2<sup>b</sup> x H-2<sup>d</sup>)F<sub>1</sub></b>	<b>(H-2<sup>b</sup> x H-2<sup>d</sup>)F<sub>1</sub></b>	<b>50% H-2<sup>b</sup> 50% H-2<sup>d</sup></b>
<b>H-2<sup>b</sup></b>	<b>(H-2<sup>b</sup> x H-2<sup>d</sup>)F<sub>1</sub></b>	<b>50% H-2<sup>b</sup> 50% H-2<sup>d</sup></b>
<b>H-2<sup>d</sup></b>	<b>(H-2<sup>b</sup> x H-2<sup>d</sup>)F<sub>1</sub></b>	<b>50% H-2<sup>b</sup> 50% H-2<sup>d</sup></b>
<b>H-2<sup>d</sup></b>	<b>H-2<sup>d</sup></b>	<b>100% H-2<sup>d</sup></b>

**Tableau 1.1** : Mise en evidence du role du thymus dans la sélection des LyT, expérience de Bevan.

A travers les différents travaux autour de la sélection thymique, deux modèles de sélection sont encore retenus (pour revue Starr, Jameson et al. 2003). Un premier modèle qualitatif a été proposé. Il repose sur l'importance de la nature du peptide présenté par le CMH. Selon ce modèle, la sélection est médiée par une interaction TCR/CMH-pAg qui induit un signal unique de sélection positive ou négative en fonction de la nature du peptide présenté. Le second modèle est quantitatif, il est basé sur l'avidité de l'interaction (somme des forces d'interaction) TCR/CMH-pAg. Si l'avidité est trop faible, le thymocyte en cours de sélection ne reçoit pas un signal suffisant pour stimuler sa survie et il meurt par négligence. Si cette interaction est de niveau modéré, le thymocyte est positivement sélectionné. Si l'avidité de cette interaction est trop forte et dépasse un certain seuil, la cellule est éliminée. Le fait qu'un ligand de faible affinité mais avec une concentration élevée puisse induire une sélection négative, supporte ce modèle. Il est important de noter que dans ce modèle les corécepteurs exprimés à la surface des thymocytes peuvent influencer la durée ou les forces d'interactions et donc le sort des thymocytes. Le modèle quantitatif est le plus accepté aujourd'hui, mais il implique que les multiples interactions TCR/CMH-pAg soient intégrées pour former un gradient de signalisation qui définit le devenir de la cellule.

Au cours du stade DP, 90% des thymocytes vont mourir après avoir subi les étapes de sélection (Palmer 2003). Certains thymocytes exprimant un TCR $\beta$  particulier sont plus touchés que d'autres en fonction de la présence ou non de super-antigènes (SAg) (pour revue Simpson, Takacs et al. 1994). Les SAg sont des protéines virales ou bactériennes qui fixent les molécules de CMH hors du site de fixation classique des Ag et qui stimulent les LyT avec un TCR $\beta$  particulier. L'activation consécutive à la reconnaissance d'un SAg endogène par un thymocyte conduit à son activation puis son élimination par sélection négative. Chez la souris la plupart des SAg endogènes sont codés par les virus MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) qui intègrent de façon stable le génome murin. Au cours de la sélection négative, selon le fond génétique de la souris plus ou moins de SAg sont exprimés et ceci conduit à une élimination plus ou moins importante de famille entière de LyT avec un TCR V $\beta$  particulier. La délétion induite par les SAg provoque des « trous » dans le répertoire des lymphocytes T  $\alpha\beta$  et constitue un bon modèle d'étude de la sélection négative.

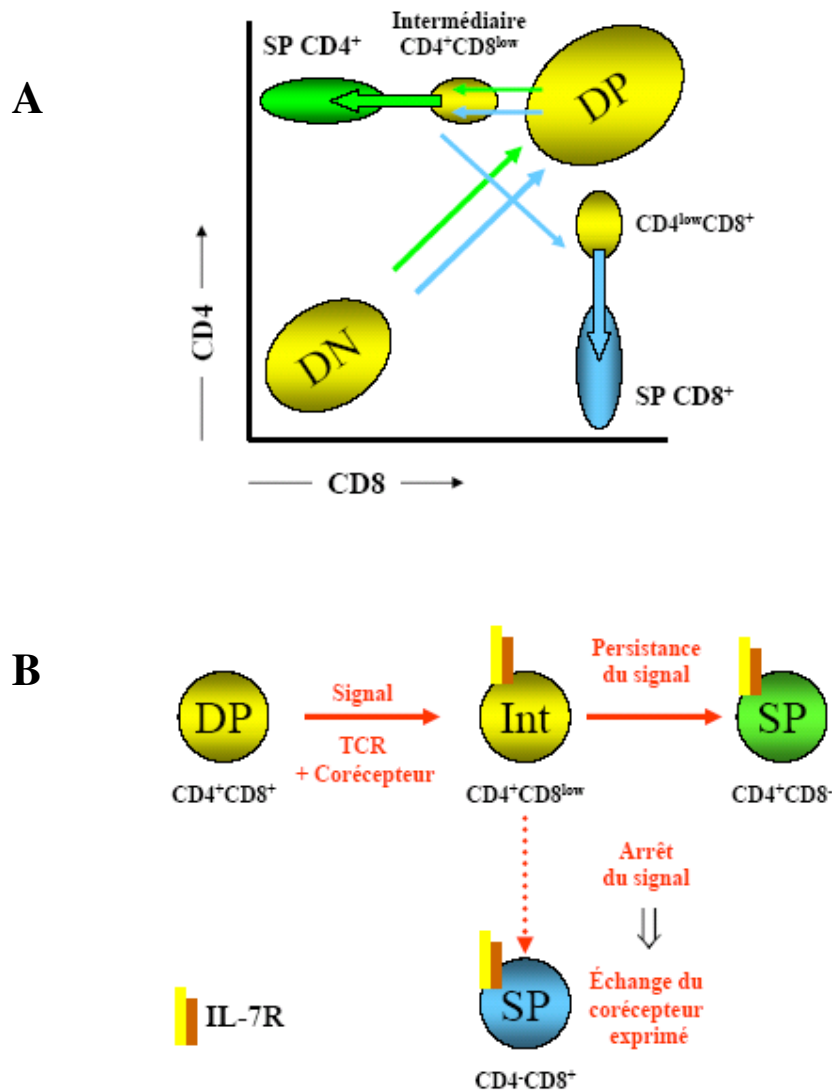
#### 4. Le choix de lignage CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> : « être ou ne pas être un CD4<sup>+</sup> »

Au cours de la sélection thymique, les cellules DP vont réprimer l'expression de l'un des corécepteurs CD4 ou CD8 et s'engager soit dans la lignée CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> constituant les précurseurs des LyT auxiliaires, soit dans la lignée CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, constituant les précurseurs des LyT cytotoxiques. Deux modèles généraux et un modèle mixte plus récemment ont entrepris d'expliquer le choix de lignage (figure 1.3 et pour revue Singer and Bosselut 2004; Kappes and He 2005; Laky and Fowlkes 2005).

♦ Le premier modèle dit « instructif » implique que ce choix s'effectue durant la sélection positive. Le TCR serait capable de reconnaître les molécules de CMH présentées sans intervention des corécepteurs. Cette interaction TCR/CMH-pAg au cours de la sélection positive va ensuite orienter le thymocyte DP vers le stade SP adéquat en fonction de la classe de CMH reconnue. Ainsi par exemple, si un TCR donné reconnaît une molécule de CMH II, cette interaction conduit à la répression de l'expression des molécules CD8 et à la maturation de cellule SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> CMH II restreintes.

♦ Selon le second modèle dit « sélectif », c'est l'ensemble d'une combinaison compatible TCR, corécepteur et CMH-pAg qui oriente le choix du lignage. Les corécepteurs sont donc importants et influencent le choix du lignage. Cela suppose que le TCR seul n'est pas capable d'interagir avec les molécules de CMH. La participation du corécepteur assure une affinité suffisante à l'interaction avec le CMH. C'est pourquoi, les cellules avec un corécepteur non adapté seront éliminées.

Ces deux modèles sont appuyés par différents résultats expérimentaux. Dans le cas du modèle instructif, l'absence d'un corécepteur doit bloquer l'engagement dans la lignée correspondante. En effet, chez les souris CD8<sup>-/-</sup>, aucune population CMH I restreinte n'a été identifiée. Par contre dans le cas des souris CD4<sup>-/-</sup>, une population CMH II restreinte minoritaire existe. Ces résultats sont plutôt en faveur du modèle instructif. Le modèle sélectif, quant à lui est appuyé par l'existence d'intermédiaires DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> chez les souris CMH II<sup>-/-</sup> ou DP CD4<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup> chez les souris CMH I<sup>-/-</sup> qui ne produiront pas de CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> respectivement.



**Figure 1.3 :** Dissection géographique et fonctionnelle du modèle cinétique.  
 (A) La différenciation des thymocytes DP en SP  $CD4^+$  (en vert) ou SP  $CD8^+$  (en bleu) suit des « chemins » de différenciation communs puis spécifiques (flèches vertes et bleues) caractérisés par des niveaux d'expression des molécules CD4 et CD8. (B) Le choix du lignage dépend des signaux perçus par les intermédiaires  $CD4^+CD8^{\text{low}}$  de développement (Int). Ces signaux sont délivrés par le TCR et le corecepteur associé ou par l'IL-7R.



♦ Le modèle mixte est apparu en 1995, il propose que l'engagement dans la lignée CD4<sup>+</sup> est sélectif alors que l'engagement dans la lignée CD8<sup>+</sup> est instructif (Suzuki, Punt et al. 1995). Par défaut, les cellules DP s'engagent dans la lignée CD4<sup>+</sup> (intermédiaire CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup>). Cet engagement aboutit aux cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> si le TCR exprimé et son corécepteur CD4<sup>+</sup> sont compatibles avec les molécules de CMH II présentées. C'est un message via le TCR qui témoigne de cette compatibilité. La reconnaissance d'une molécule de CMH I détourne l'engagement vers la lignée CD8<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> → CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>). En utilisant un système de culture in vitro de cellules DP traitées à la pronase (cette enzyme clive les molécules CD4 et CD8 exprimées à la surface des thymocytes), l'équipe d'Alfred Singer a analysé les corécepteurs ré-exprimés à partir de DP CMH I<sup>-/-</sup> ou CMH II<sup>-/-</sup>. Leurs travaux ont montré que l'engagement vers la lignée CD8<sup>+</sup> nécessitait un signal dépendant des molécules de CMH I alors que l'engagement vers la lignée CD4<sup>+</sup> n'avait pas besoin de signal provenant de CMH II (pour revue Singer and Bosselut 2004).

A présent, il semblerait que le modèle mixte soit le plus vraisemblable. Les expériences les plus récentes menées par le groupe de Singer, ont permis de compléter un peu plus ce modèle. On préférera plutôt parler du modèle cinétique -kinetics receptor signaling model- (Cf figure 1.3 et pour revue Singer and Bosselut 2004). Une première interaction TCR/CMH-pAg forte au niveau des cellules DP, inhiberait transitoirement l'expression de la molécule CD8 $\alpha$ , aboutissant aux cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup>. Puis, un deuxième signal passant par le TCR ou le récepteur à l'IL-7 (IL-7R) orienterait la cellule vers la lignée CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> respectivement. Un signal via le TCR va maintenir la répression des molécules CD8 $\alpha$  et un signal via l'IL-7R va déclencher la répression des molécules CD4 et réactiver l'expression des molécules CD8 $\alpha$ . Ceci pourrait aussi expliquer pourquoi la cinétique de génération des SP CD8<sup>+</sup> (avec un développement en deux temps) est plus lente que celle des SP CD4<sup>+</sup> (Lucas, Vasseur et al. 1995) ou pourquoi les thymocytes SP CD4<sup>+</sup> apparaissent les premiers au cours de l'ontogénie (Ceredig and MacDonald 1982). Les signaux médiés par le TCR et l'IL-7R sont encore à définir, cependant ils sembleraient faire intervenir des facteurs de transcription (FT) spécifiques pour chacun des lignages : c-Krox (ou Th-POK) pour les CD4<sup>+</sup> et Runx3 pour les CD8<sup>+</sup> (pour revue Bosselut 2004).

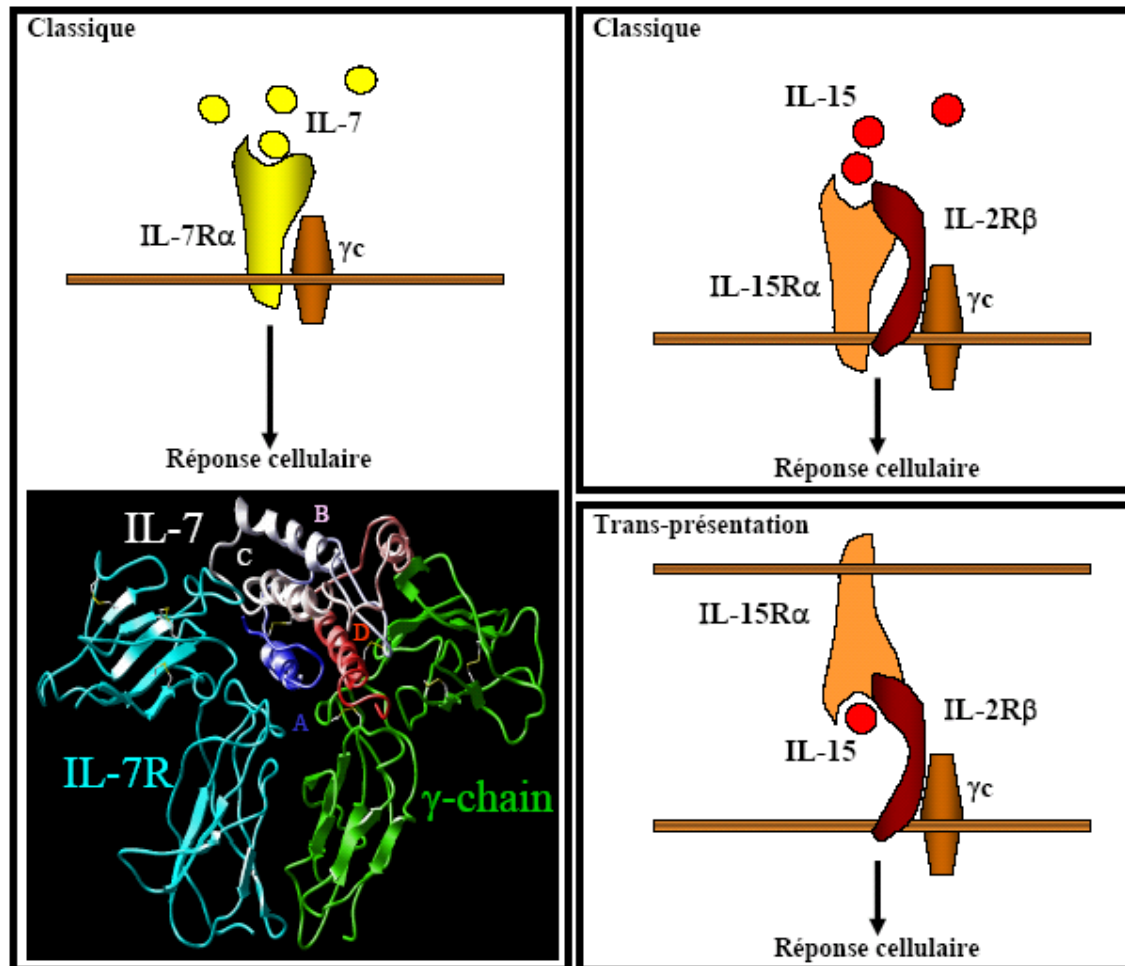
## Partie 3 : IL-7 et différenciation thymique des lymphocytes T $\alpha\beta$

### 1. Généralités sur l'IL-7

L'IL-7 est une cytokine essentielle pour le développement, la survie et la prolifération des lymphocytes. Les effets de l'IL-7 sont médiés par son récepteur qui est composé de deux chaînes, la chaîne IL-7R $\alpha$  ou CD127 qui assure la spécificité de la fixation de l'IL-7 et la chaîne  $\gamma$ c ou CD132 de transduction du signal (Cf figure 1.4). Les interleukines -2, -4, -7, -9, -15 et -21 appartiennent à la famille des « cytokines  $\gamma$ c-dépendantes » parce que leurs effets sont médiés par la chaîne de transduction du signal  $\gamma$ c (pour revue Kovanen and Leonard 2004). Parmi les souris déficientes pour les cytokines, seuls les animaux IL-7<sup>-/-</sup> présentent des altérations majeures du développement lymphoïde (von Freeden-Jeffry, Vieira et al. 1995). Ceci souligne l'importance de cette cytokine mais aussi certainement la diversité des signaux médiés par la voie  $\gamma$ c en fonction du message extracellulaire délivré par ces 6 cytokines. Dans cette partie, nous discuterons d'abord des connaissances générales sur cette cytokine, sa production, des débuts de la caractérisation de sa voie de signalisation et enfin des effets pléiotropiques de l'IL-7 au cours de la thymopoïèse. Les effets de l'IL-7 dans le contrôle de l'homéostasie des différentes populations LyT périphériques seront abordés dans la partie suivante de ce manuscrit.

L'IL-7 a été identifiée en 1988 par Anthony Namen (Namen, Lupton et al. 1988). Initialement, elle était décrite comme un facteur de croissance présent dans les surnageants de culture de cellules stromales et supportant le développement des lignées de LyB mis en culture (Lee, Namen et al. 1988; Namen, Lupton et al. 1988). Le clonage de cette cytokine puis sa production sous forme recombinante a permis par la suite de tester les propriétés de cette molécule. Une série d'injections d'IL-7 dans des souris provoque une augmentation du nombre de LyB et LyT. Au contraire, l'injection d'anticorps neutralisants la cytokine ou ses effets en ciblant son récepteur entraîne une lymphopénie sévère chez les animaux traités (Morrissey, Conlon et al. 1991; Grabstein, Waldschmidt et al. 1993). Plus tard, le phénotype lymphopénique sévère d'animaux déficients pour l'IL-7 ou les chaînes de son récepteur, ou l'identification de patients avec une anomalie génétique sur le gène de l'IL-7 ou de son récepteur sont venus confirmer ces premiers résultats (Grabstein, Waldschmidt et al. 1993; Peschon, Morrissey et al. 1994; von Freeden-Jeffry, Vieira et al. 1995; Puel, Ziegler et al.

1998). L'IL-7 est la première cytokine non-redondante décrite, ce qui fait d'elle une cytokine très importante.



**Figure 1.4 :** Représentation schématique des récepteurs à l'IL-7 et 15.

A gauche, schéma du récepteur IL-7 (en haut) et modélisation 3D de la cytokine avec 4 hélices  $\alpha$  (A, B, C et D) couplées au complexe récepteur (en bas). A droite schéma du récepteur IL-15. Il existe deux voies de présentation de l'IL-15, une voie classique (en haut) et une voie indirecte ou dite par trans-présentation (en bas). Ainsi, l'IL-15 peut exercer ses effets même sur des cellules qui n'expriment pas toutes les composantes de son complexe récepteur.

## 2. Sites de production de l'IL-7 et cellules IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>

De nombreuses cellules produisent l'IL-7, les cellules thymiques ou intestinales fœtales, les cellules du stroma thymique, hépatique ou de la moelle, différentes cellules épithéliales, différentes catégories de cellules dendritiques, le rein et même le cerveau (pour revue Fry and Mackall 2002). Cependant, la majorité de ces travaux est basée sur des techniques d'amplification par RT-PCR des transcrits de l'IL-7. L'absence d'Ac anti-IL-7 murine n'autorise pas une caractérisation plus fine des cellules productrices d'IL-7. En revanche, il existe des Ac anti-IL-7 humaine, qui permettent par ELISA de titrer la quantité d'IL-7 dans le sérum de patients. Malgré le nombre important de types cellulaires produisant l'IL-7, peu de données concernant la régulation de l'expression de cette interleukine sont disponibles. De plus, *in vivo* les cellules qui fournissent l'IL-7 aux précurseurs lymphoïdes ou au LyT ne sont pas identifiées, et le mode d'action local (paracrine) ou à distance (endocrine) de l'IL-7 peut encore être discuté.

Le gène de l'IL-7 est localisé sur le chromosome 3 de la souris, il mesure 41 kb et produit une protéine de 154 acides aminés et environ 18 kDa après modifications post-traductionnelles (clivage du peptide signal dans la région N-terminale et glycosylations). La structure cristallographique de cette cytokine n'est pas encore disponible, par contre un modèle 3D basé sur la structure de l'IL-2 et IL-4 est déjà décrit (figure 1.4 et Kroemer, Dougherty et al. 1996). Le promoteur de l'IL-7 présente des caractéristiques non-conventionnelles, en effet il ne possède pas de boîte-TATA, par contre il possède un site de fixation pour le FT E12 (Lupton, Gimpel et al. 1990). E12 appartient à une famille de FT importants pour le développement lymphoïde (pour revue Bain and Murre 1998). La région du promoteur du gène de l'IL-7 contient aussi un élément de réponse à l'interféron  $\gamma$  (ISRE). Ce qui explique pourquoi les kératinocytes traités à l'interféron- $\gamma$  reprennent activement la transcription de l'IL-7 (Ariizumi, Meng et al. 1995).

L'IL-7R $\alpha$  est exprimée par les cellules hématopoïétiques et principalement les cellules lymphoïdes. On retrouve des cellules IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> au sein des précurseurs de LyB (jusqu'au stade pré-BII) et LyT (jusqu'au stade DN3-4), puis au sein des cellules T naïves et mémoires à des niveaux d'expression différents (pour revue Fry and Mackall 2002). Il est important de noter qu'on peut ne pas ou très faiblement détecter l'expression de l'IL-7R $\alpha$  par cytométrie en flux sur certaines cellules comme les DN1, néanmoins ces cellules répondent spécifiquement à

l'IL-7. Ceci témoigne d'une sensibilité certainement très importante à l'IL-7 pour certains types cellulaires. Il faut aussi souligner que quelques lignées de cellules tumorales non hématopoïétiques expriment aussi l'IL-7R $\alpha$ , pouvant suggérer que des signaux constitutifs via ce récepteur pourraient favoriser la transformation cellulaire (Cosenza, Gorgun et al. 2002).

Le gène de l'IL-7R $\alpha$  est localisé sur le chromosome 15 de la souris et mesure environ 22 kb. Il produit une protéine de 439 acides aminés et environ 50 kDa. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs aux cytokines de type I. Le niveau d'expression de ce récepteur semble être contrôlé de manière très fine. La variation du niveau d'expression de l'IL-7R $\alpha$  au cours de la thymopoïèse (DN IL-7R $\alpha^+$   $\rightarrow$  DP IL-7R $\alpha^-$   $\rightarrow$  SP IL-7R $\alpha^+$ ) est un bon exemple. Cependant encore une fois très peu de données concernant les mécanismes de régulation de l'expression de l'IL-7R $\alpha$  sont disponibles pour le moment. Néanmoins l'étude du promoteur du gène de l'IL-7R $\alpha$ , a montré qu'il portait un motif GGAA de fixation du FT PU.1. Ce FT est important pour le développement des LyB, mais il est sans effet connu pour le développement des LyT (DeKoter, Lee et al. 2002). Par contre ce même motif est capable de fixer aussi les FT GABP $\alpha$  et  $\beta$  (Xue, Bollenbacher et al. 2004). Ce sont ces FT qui semblent régler la transcription de l'IL-7R $\alpha$  dans les LyT. Le promoteur du gène de l'IL-7R $\alpha$  contient aussi une séquence non codante conservée (CNS-1) qui permet la fixation des récepteurs aux glucocorticoïdes (GC) (Lee, Shibata et al. 2005). Ces hormones fixent leurs récepteurs (GR) au niveau du cytosol, celui-ci peut alors gagner le noyau et activer la transcription de gènes spécifiques. Les GC activent la transcription de l'IL-7R $\alpha$  au niveau des LyT. Le rôle de cette boucle de régulation n'est pas encore élucidé.

Récemment, on a montré que l'IL-7 et les autres cytokines  $\gamma$ c dépendantes pouvaient aussi contrôler le niveau d'expression de l'IL-7R $\alpha$  (Xue, Kovanen et al. 2002; Park, Yu et al. 2004). Ceci a conduit à appuyer un modèle « altruiste » du développement thymique (Munitic, Williams et al. 2004). En effet les cellules ayant reçu un signal de survie par l'IL-7 via le complexe IL-7R $\alpha$ - $\gamma$ c arrêteraient de fixer l'IL-7 disponible dans l'environnement en stoppant l'expression de l'IL-7R $\alpha$ . Ainsi ces cellules autorisent les autres à fixer l'IL-7 à leur tour. Ceci expliquerait pourquoi les cellules DP sont IL-7R $\alpha^-$  et autorisent les cellules DN IL-7R $\alpha^+$  à fixer l'IL-7 et à continuer de se développer. De la même manière, en périphérie, un maximum de cellules LyT peut continuer de survivre en proliférant grâce à ce « partage altruiste » des ressources disponibles (Munitic, Williams et al. 2004; Park, Yu et al. 2004).

Par ce mécanisme on peut expliquer pourquoi le nombre de clones T présents est toujours important et comment le système immunitaire préserve une diversité importante du répertoire.

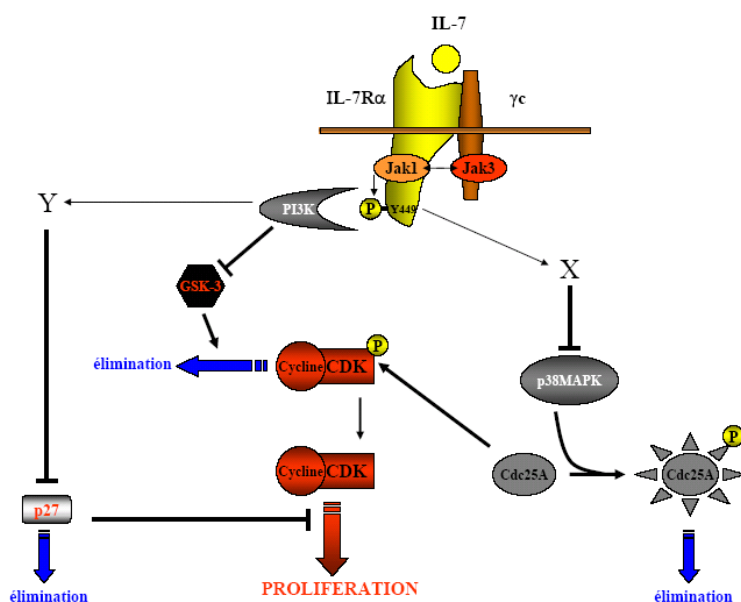
### 3. Voie de signalisation médiée par le trio IL-7/IL-7R $\alpha$ - $\gamma$ c

Récemment, l'équipe de Scott Durum a débuté des travaux importants sur la caractérisation biochimique des voies de signalisation médiées par l'IL-7 après fixation sur son récepteur (Jiang, Li et al. 2004; Li, Jiang et al. 2004). Ces travaux ont été réalisés sur une lignée murine de LyT dépendante de l'IL-7 et exprimant différentes formes mutées de l'IL-7R $\alpha$ . L'effet de ces mutations a permis d'établir une carte des domaines d'interactions entre la partie intracellulaire de l'IL-7R $\alpha$  et les différentes kinases ou molécules adaptatrices du cytosol. De plus, ces travaux ont mis à jour la complexité de cette voie de signalisation. En effet, selon le domaine intracellulaire impliqué, les kinases recrutées ainsi que les effets biologiques associés sont différents. On distingue 4 régions intracellulaires conservées au niveau de la chaîne IL-7R $\alpha$ . La région S, riche en sérine, ne semble contrôler aucune activité biologique, en effet sa mutation n'entraîne pas l'apparition d'un phénotype particulier *in vitro*. La région A riche en acides aminés, fixe les kinases à tyrosine de la famille Src comme par exemple p56Lck ou p59Fyn. La région T contient 3 tyrosines conservées Y401, Y449 et Y456. Enfin, il y'a la région box1 qui contient un domaine conservé sans motif structural particulier et proche de la membrane. La tyrosine Y449 et la région box1 sont impliquées dans le recrutement de la Phosphoinositide 3-Kinase (PI3-K), de la Janus Kinase 1 (Jak1), l'interaction avec Jak3 portée par la chaîne  $\gamma$ c et le recrutement du FT activateur de la transcription 5A ou B (STAT5A/B). Ce dernier sera activé après phosphorylation, rejoindra le noyau et activera la transcription de gènes spécifiques impliqués dans la survie et la prolifération des précurseurs de LyT ou des LyT. De manière comparable aux animaux IL-7<sup>-/-</sup>, IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> ou  $\gamma$ c<sup>-/-</sup>, les animaux PI3-K<sup>-/-</sup>, JAK1<sup>-/-</sup>, JAK3<sup>-/-</sup> ou STAT5A/B<sup>-/-</sup> présentent des anomalies plus ou moins sévères du développement T et ou B (Cf tableau 1.2).

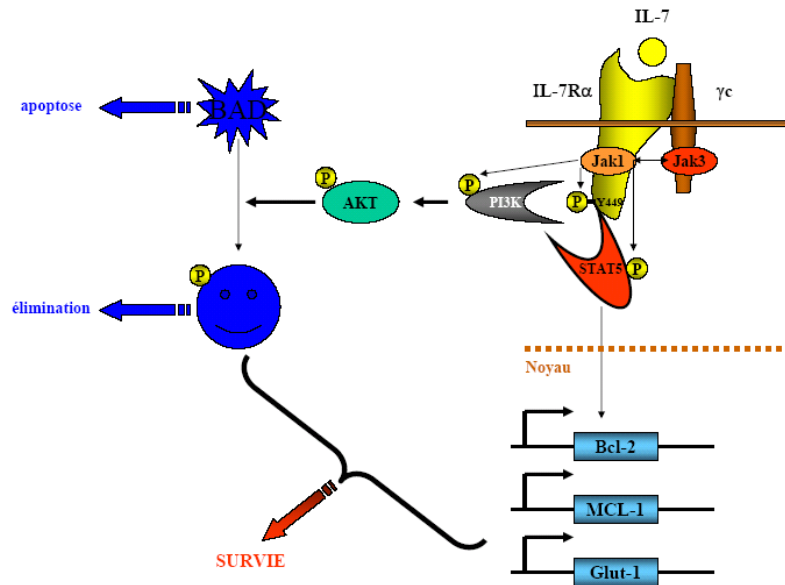
Molécule KO	Cytokines affectées							Défaut d'homéostasie :		
	IL-2	IL-4	IL-7	IL-9	IL-15	IL-21	Autres	LyT	LyB	Autres
IL-2	O							O		
IL-4		O						O	O	
IL-7			O					O	O	
IL-9				O						O
IL-15					O			O		O
IL-2R alpha	O							O		
IL-2R beta	O				O	O		O		O
IL-4R alpha		O					IL-13	O	O	O
IL-7R alpha			O				TSLP	O	O	
IL-15R alpha					O			O		O
IL-21R alpha						O			O	
gamma-c	O	O	O	O	O	O		O	O	O
Jak1	O	O	O	O	O	O	Beaucoup	Létale	Létale	Létale
Jak3	O	O	O	O	O	O		O	O	O
STAT1						O (mineur)	IFN gamma	O		
STAT3	O (mineur)		O (mineur)	O (mineur)	O (mineur)	O	Beaucoup	Létale	Létale	Létale
STAT5A	O		O	O	O	O (mineur)	Beaucoup	O		
STAT5B	O		O	O	O	O (mineur)	Beaucoup	O		O
STAT6		O					IL-13	O (mineur)	O	

**Tableau 1.2 :** Principales cytokines  $\gamma_c$ -dépendantes impliquées dans l'homéostasie des lymphocytes. Les KO réalisés sur les cytokines, leurs récepteurs et les molécules de signalisation associés sont indiqués à gauche. Les effets (O) sont indiqués à droite. Les molécules et effets concernant la voie IL-7 sont en rouges. Adapté de Kovanen & Leonard 2004.

En conclusion, l'IL-7 initie des voies multiples de signalisation entraînant la survie ou la prolifération des cellules IL-7R $\alpha^+$ . Cependant, l'ensemble des molécules impliquées en aval du récepteur et les cibles génétiques sont encore mal définis. Les figures 1.5 et 1.6, reprennent les données actuelles concernant les voies de signalisation IL-7-dépendantes impliquées dans la survie cellulaire ou la prolifération des LyT.



**Figure 1.5 :** Voie de signalisation IL-7 dépendante impliquée dans la prolifération des LyT. D'après Jiang & al. 2004 et Li & al. 2004.



**Figure 1.6 :** Voie de signalisation IL-7 dépendante impliquée dans la survie des LyT. L'IL-7 active la transcription de gènes anti-apoptotiques (Bcl-2 et MCL-1) ou important pour le métabolisme (Glut-1) et donc la survie des LyT. D'autre part, l'IL-7 favorise la dégradation de la protéine pro-apoptotique BAD. Ceci conduit à une balance en faveur de la survie des LyT. D'après Jiang & al. 2004 et Li & al. 2004.

#### 4. Effets de l'IL-7 sur la différenciation thymique : *de la survie au lignage*

##### *a. Les premiers résultats*

Initialement, l'IL-7 a été décrite comme un facteur important pour le développement des LyB, puis de la même façon cette cytokine s'est avérée être cruciale pour le développement des LyT (pour revue Fry and Mackall 2002). En effet, les animaux IL-7<sup>-/-</sup>, IL-7Rα<sup>-/-</sup> ou γc<sup>-/-</sup> présentent tous une lymphopénie B et T sévère (Cf tableau 1.2). On observe une réduction >10 fois du nombre de LyT αβ ou LyB, et même chez la souris une absence totale de LyT γδ. La restauration presque normale de la thymopoïèse et de la lymphopoïèse B chez les animaux IL-7<sup>-/-</sup> surexprimant le gène anti-apoptotique Bcl-2 a conduit à proposer que l'IL-



IL-7 est principalement un facteur de survie pour le développement des cellules lymphoïdes (Maraskovsky, O'Reilly et al. 1997). Cependant, le développement des LyT  $\gamma\delta$  n'est toujours pas restauré indiquant que l'IL-7 cache d'autres rôles que la promotion de la survie cellulaire et notamment pour le développement des LyT  $\gamma\delta$ . Des analyses ultérieures sont venues confirmer cette hypothèse. Dans le thymus, au sein des DN, le signal médié par l'IL-7 et son récepteur participe à l'activité de recombinaison V(D)J au niveau des loci TCRB, TCRD et TCRG. L'accessibilité des loci TCR est importante pour autoriser ou non le recrutement du complexe de recombinaison, cette accessibilité dépend entre autre du niveau de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones. Le signal conduit par l'IL-7R $\alpha$  entraîne une déméthylation de ces loci et une hyperacétylation des histones qu'ils contiennent (pour revue Muegge, Young et al. 2003). Comme l'IL-7 est cruciale pour le développement des LyT  $\gamma\delta$ , on peut supposer que les DN requièrent un signal via l'IL-7 pour favoriser les réarrangements  $\gamma$  et/ou  $\delta$  et permettre le développement de LyT  $\gamma\delta$ . Mis à part que le FT STAT5 est important pour ces processus de réarrangements IL-7 dépendant, peu d'autres données sont disponibles pour le moment.

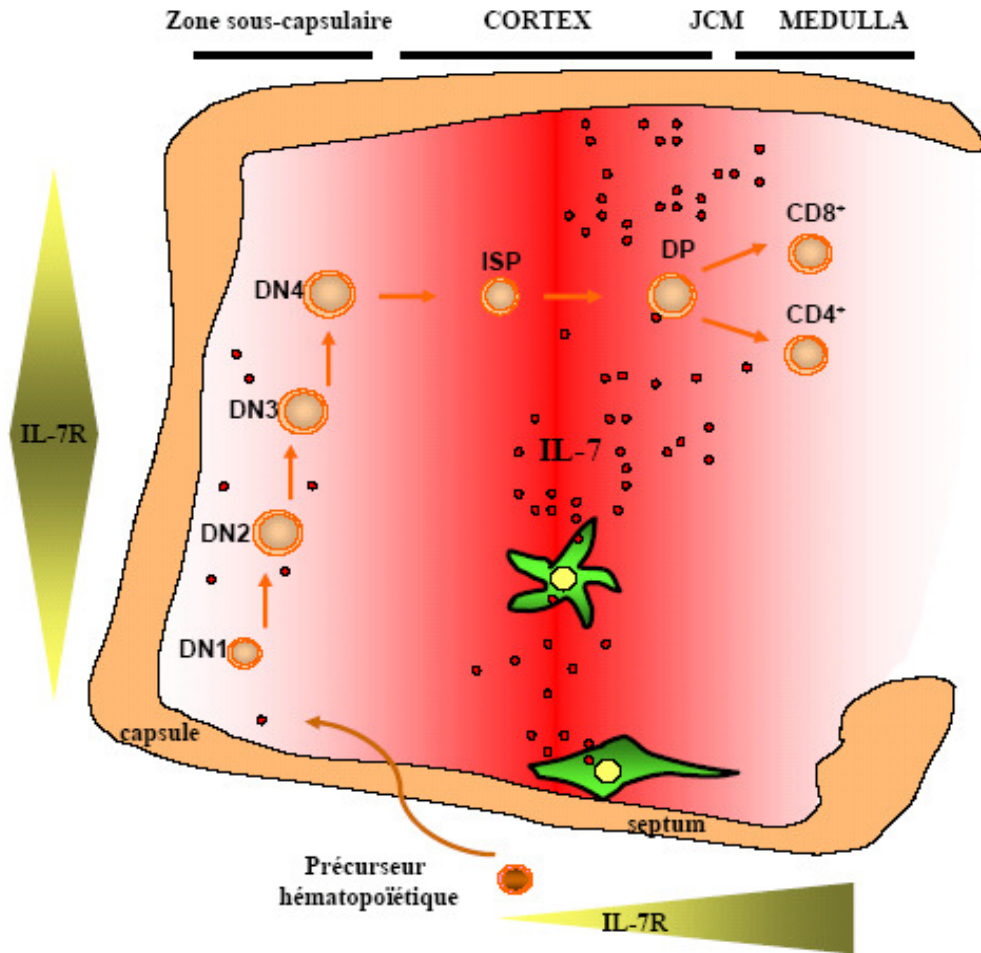
#### *b. Les résultats plus récents*

L'ensemble de ces travaux a montré très tôt l'importance de l'IL-7 dans la thymopoïèse. Agissant de manière très précoce sur le développement des LyT, l'étude de sa participation sur les étapes plus tardives du développement LyT a été freinée. Des études plus récentes et principalement celles conduites ces cinq dernières années, ont pu caractériser d'autres aspects de l'importance de l'IL-7 dans la différenciation thymique.

Différents types de progéniteurs lymphoïdes capables de générer des LyT et décrits au niveau de la moelle osseuse, du sang ou encore du thymus sont CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>cKit<sup>+</sup> et IL-7R $\alpha$ <sup>low</sup> (pour revue Pelayo, Welner et al. 2005). Bien que l'origine ou encore le potentiel de différenciation de ces précurseurs ne soient pas encore clairs, le fait qu'ils expriment l'IL-7R $\alpha$  faiblement mais surtout qu'ils répondent à l'IL-7 pourrait signifier que certains signaux médiés par l'IL-7 sont importants pour maintenir leur survie ou leur prolifération. Parmi les cellules DN1, 5 types ont été caractérisés : DN1a, b, c, d et e (Porritt, Rumfelt et al. 2004). Ce sont majoritairement les cellules DN1a et b qui s'engageront dans la lignée T. Ces précurseurs sont IL-7R $\alpha$ <sup>low</sup>. On peut imaginer que dans un environnement comme le thymus qui produit

de l'IL-7, l'expression de l'IL-7R $\alpha$  par certaines cellules confère un avantage sélectif qui *in fine* favorise la différenciation T. Des travaux menés *in vitro* sur des précurseurs de thymocytes adultes corroborent cette hypothèse. En effet, on sait que le système de culture de différenciation de LyT à partir de précurseurs hématopoïétiques sur les cellules stromales OP9-DL1 nécessite de l'IL-7 (Schmitt and Zuniga-Pflucker 2002; Schmitt, Ciofani et al. 2004). D'autre part, Balciunaite G. et al. ont montré avec des expériences de FTOC que l'IL-7 favorise l'engagement vers la lignée lymphoïde et myéloïde (macrophages) des cellules DN1 et DN2 transférées (Balciunaite, Ceredig et al. 2005). Cependant au delà du stade DN3, l'IL-7 limite l'engagement dans la lignée lymphoïde, c'est l'expression du pré-TCR en concert avec la voie de signalisation Notch qui participe à la différenciation terminale des DN et leur passage vers le stade DP (Ciofani, Schmitt et al. 2004; Balciunaite, Ceredig et al. 2005).

Le niveau d'expression de l'IL-7R $\alpha$  est très variable au cours de la thymopoïèse (Cf figure 1.7). Les DN expriment ce récepteur jusqu'au stade DN3 principalement. Puis ce n'est qu'après la transition DP $\rightarrow$ SP qu'on identifie à nouveau des cellules IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>. Cette dynamique d'expression est capitale pour assurer la thymopoïèse. En effet, il semblerait que les cellules DN et DP entrent en compétition pour l'IL-7 disponible. Or les DP sont plus nombreux et pourraient, en consommant à outrance l'IL-7 disponible, affecter les capacités de survie des DN (Munitic, Williams et al. 2004). A terme, ceci conduirait à stopper la thymopoïèse en réduisant la maturation des DN et leur transition vers le stade DP. La suppression de l'expression de l'IL-7R $\alpha$  au niveau des cellules DP pourrait en quelque-sortie être « un acte altruiste » nécessaire pour maintenir la différenciation des LyT. Yu & al. ont complété cet aspect finaliste en montrant que le maintien de l'expression des l'IL-7R $\alpha$  au delà du stade DN est néfaste (Yu, Erman et al. 2004). Il contribue à limiter l'expression de FT particuliers : le facteur 1 des cellules T (TCF-1), le facteur 1 enhancer des lymphocytes (LEF-1) et l'isoforme t du récepteur nucléaire orphelin  $\gamma$  apparenté aux récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (ROR $\gamma$ t). Ces FT sont nécessaires à la survie des cellules DP et aux réarrangements du locus TCR $\alpha$ . Par conséquent l'arrêt de l'expression de l'IL-7R $\alpha$  à la fin du stade DN (à la transition DN4-ISP) est un pré-requis pour le passage DN $\rightarrow$ DP.



**Figure 1.7 :** Expression de l'IL-7 (en rouge) et cellules IL-7R $\alpha^+$  (niveau d'expression représenté en jaune sur les cotés) au niveau du thymus. Les cellules rondes représentent les thymocytes en cours de maturation et les cellules vertes représentent les cellules du stroma thymique qui synthétisent de l'IL-7. (JCM pour jonction cortico-médullaire). Adapté de Munitic & al. 2004 et Yu & al. 2004.

Enfin, l'IL-7 serait importante pour le lignage CD4/CD8 et la prolifération des cellules SP après la sélection positive (Yu, Erman et al. 2003). Dans le « modèle cinétique » du choix du lignage, au niveau des cellules intermédiaires CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup>, l'expression de l'IL-7R $\alpha$  est importante. Les cellules qui s'engageront dans la voie CD4<sup>+</sup> sont plus nombreuses, et ne dépendent pas de l'IL-7. En revanche, l'engagement dans la voie CD8<sup>+</sup> et la survie des SP CD8<sup>+</sup> nécessitent un signal dépendant de l'IL-7. Celui-ci permettra de stopper la transcription des molécules CD4<sup>+</sup>, d'activer l'expression de Bcl-2 et de reprendre la transcription de la molécule CD8 $\alpha$  (Yu, Erman et al. 2003). Ceci nécessite vraisemblablement la fixation du FT STAT5 phosphorylé au niveau de la région enhancer (E8<sub>III</sub>) du promoteur du gène CD8 $\alpha$  (Sarafova, Erman et al. 2005). Il est clair que d'autres FT sont impliqués dans le choix du lignage CD4/CD8, notamment c-Krox (ou Th-Pok) pour les CD4<sup>+</sup> et Runx3 pour les CD8<sup>+</sup> (pour revue Bosselut 2004). Il reste encore à établir si l'IL-7 peut contrôler leur expression ou leur activité et comment. Après sélection et engagement, les cellules SP CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> continuent à maturer dans le thymus et subissent 5-6 cycles de divisions. Cette division est dépendante de l'IL-7 produite par les cellules épithéliales du thymus et nécessite la ré-expression de l'IL-7R $\alpha$  par les thymocytes après sélection positive (Hare, Jenkinson et al. 2000). Le rôle de cette expansion intrathymique plus fréquente dans les thymus des nouveaux-nés n'est pas encore très clair.

Nous pouvons donc dire que l'ensemble des travaux menés depuis la découverte de l'IL-7 montre que cette molécule est centrale dans le développement lymphoïde. Cette cytokine a des propriétés pléiotropiques et intervient dans différentes étapes du développement des LyT. Elle exerce des propriétés trophiques (survie et prolifération) mais aussi plus complexes comme sa participation aux réarrangements V(D)J ou au lignage CD4/CD8. L'IL-7 est produite dans bon nombre d'organes et en particulier dans les organes lymphoïdes périphériques. Aussi, ces propriétés trophiques contribuent à maintenir l'homéostasie des LyT périphériques. C'est ce que nous aborderons dans la partie suivante du manuscrit après quelques rappels sur la notion physiologique d'homéostasie, son application au système immunitaire et les façons de l'étudier.

## Partie 4 : Homéostasie des populations lymphocytaires T $\alpha\beta$

### 1. Concept et définition

Le concept d'homéostasie peut être attribué à Claude Bernard. Très tôt, il a suggéré qu'un organisme possède un ou des mécanismes de contrôle de son équilibre interne malgré les modifications de son environnement pour assurer sa survie. Ainsi par exemple, il existe un contrôle strict de la température corporelle mettant en jeu des mécanismes physiologiques bien décrits. Le terme « homéostasie » a été introduit plus tard par le physiologiste Walter Cannon pour décrire la tendance d'un organisme à retourner à son état original suite à un stress (pour revue Stockinger, Barthlott et al. 2004). Appliqué à un système ou organe le terme d'homéostasie désignera les mécanismes internes de régulation propres à ce système ou organe. La régulation de la taille ou du nombre de cellule d'un organe est soumise à un contrôle homéostatique. Aussi, dans le système immunitaire, des mécanismes homéostatiques sont à l'origine du contrôle du nombre de cellules qui le compose ou du retour à l'équilibre après une perturbation.

En l'absence de stimulation antigénique, le compartiment lymphocytaire T périphérique est stable chez l'adulte. Toutefois cette population est loin d'être statique, au contraire elle est dynamique. Les cellules du système immunitaire sont renouvelées en permanence, environ 40% du compartiment des LyT naïfs sont renouvelés après 20 jours (Tanchot, Rosado et al. 1997). L'état d'équilibre du compartiment lymphocytaire T est assuré par une balance entre les processus de production des LyT (la thymopoïèse et la prolifération périphérique) et la destruction des LyT périphériques. Cet équilibre peut être bouleversé de manière transitoire au cours d'une réponse immunitaire ou encore de manière chronique comme dans certaines pathologies (HIV ou lymphome).

L'homéostasie lymphocytaire s'applique à l'ensemble des populations lymphocytaires, « naïves » et « mémoires ». Elle est déterminée par des processus actifs qui contrôlent pour chaque sous-population présente en périphérie les apports et les pertes cellulaires. Dans ce chapitre nous aborderons les techniques qui permettent d'étudier la dynamique des populations lymphocytaires et ensuite, nous détaillerons les mécanismes qui assurent le maintien des sous-populations de LyT.

## **2. Techniques d'études de la dynamique des populations lymphocytaires T en périphériques en l'absence de stimulation antigénique**

Différents systèmes expérimentaux ont été utilisés depuis environ trois décennies pour évaluer la dynamique des populations lymphocytaires. Les techniques principalement retrouvées dans la littérature ainsi que leurs avantages et inconvénients sont présentés et discutés ci-dessous.

### *a. Méthode stathmocinetique*

Ces méthodes sont basées sur le blocage de cellules en cycle. La vincristine par exemple, permet de bloquer les cellules en métaphase. En injectant cette drogue *in vivo*, à différents intervalles de temps, l'expérimentateur peut avoir accès au taux d'entrée en métaphase dans une population en prolifération. Ceci correspond, dans un système à l'état d'équilibre, au taux de production cellulaire. Il est difficile d'évaluer la toxicité de la drogue sur les cellules en interphase et la modification éventuelle de la survie des cellules bloquées en métaphase.

### *b. Arrêt de la division cellulaire*

L'injection de drogue cytostatique, tel l'hydroxyurée (HU), peut tuer de façon relativement spécifique les cellules en division. Dans le système immunitaire, les cellules précurseurs sont affectées par ce traitement et la lymphopoïèse est bloquée (pour revue Freitas, Rocha et al. 1986). Si on considère que les cellules T périphériques ne se divisent pas ou peu, elles ne ressentent aucune toxicité. Cette technique permet donc d'étudier la persistance des cellules à la périphérie. On peut donc avoir une indication de leur capacité de survie et leur demi-vie en absence de production centrale. Parmi les conséquences indésirables de cette technique, on note une forte susceptibilité de l'épithélium intestinal qui contient des précurseurs avec un taux de renouvellement important.

Plus récemment, des souris transgéniques pour le gène de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès HSV-1, sous le contrôle des enhancers du promoteur CD4, ont été réalisées (Bellier, Thomas-Vaslin et al. 2003). Chez ces animaux, l'administration de Gancyclovir® tue sélectivement les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> qui expriment la TK et qui incorporent cet

analogue de base au cours de la phase S du cycle cellulaire. Ce traitement bloque la production centrale de cellules T en tuant les précurseurs lymphoïdes mais également les LyT périphériques en division.

#### *c. Incorporation de précurseurs de base de l'ADN*

L'incorporation de nucléotides marqués tels que la thymidine marquée au tritium ( $^3\text{HT}$ ) ou la bromodeoxyuridine (BrdU), permet d'apprécier les taux de division cellulaire *in vivo* (pour revue Asquith, Debacq et al. 2002). En effet, l'injection de ces analogues de base permet de marquer spécifiquement les cellules en phase S. Les LyT et leur progénie peuvent être suivis et les taux d'accumulation ou de clairance des cellules marquées sont utilisés pour apprécier l'activité de prolifération et les fractions respectives de cellules à courte et longue durée de vie dans une population hétérogène. Cependant, cette technique ne permet pas de discriminer les cellules périphériques au repos issues de précurseurs en division, des cellules périphériques elles-mêmes en division. De plus, la toxicité de ces molécules est un problème majeur, elle entraîne des perturbations au sein du pool de nucléotides endogènes.

#### *d. Dilution des TREC*

Lors du réarrangement des chaînes du TCR et en particulier pour le locus TCRA, des cercles d'excision (TREC) sont générés. Ces épisomes non répliqués sont retrouvés de manière très abondante dans les populations de RTE. Des techniques de PCR quantitatives ont été utilisées pour quantifier les TREC au sein du thymus pour avoir une estimation de la production thymique. Ces techniques peuvent aussi être mises à profit pour quantifier les TREC sur les populations de LyT périphériques. En comparaison aux RTE, les LyT périphériques ont une faible fréquence de TREC et celle-ci diminue avec le temps. Ceci témoigne bien d'une dynamique lymphocytaire périphérique (pour revue Hazenberg, Verschuren et al. 2001).

#### *e. Etude du cycle cellulaire des lymphocytes T*

L'analyse de l'expression des gènes du cycle cellulaire comme les cyclines D2/D3 spécifique de la phase G1 et la cycline E associée à la phase S, l'expression du marqueur Ki-67 antigène nucléaire spécifique des cellules entrées en cycle cellulaire, ou encore le contenu

cellulaire en ADN et ARN constituent d'autres moyens d'investigation de la fréquence de division des LyT périphériques directement analysables par cytométrie. Ainsi, les LyT naïfs présentent une proportion moins importante de cellule en phase S et G2/M du cycle cellulaire que les LyT mémoires (Veiga-Fernandes and Rocha 2004). Cependant ces techniques surestiment certainement la fréquence de division cellulaire dans la mesure où les cellules entrées en cycle ou qui expriment ces antigènes ne se diviseront pas forcément. Mais c'est un témoignage important de la dynamique des populations lymphocytaires périphériques.

#### *f. Expérience de transfert cellulaire*

L'existence de souches de souris syngéniques portant un marqueur allotypique distinct permet de suivre des cellules issues d'un donneur avec un marqueur allotypique 1 dans un receveur portant un marqueur allotypique 2. Les allotypes représentent différentes formes alléliques engendrées par des mutations germinales stables portant sur des parties constantes d'un gène. Les marqueurs allotypiques utilisés le plus souvent sont : CD44.1 ou CD44.2 (Pgp-1.1 ou Pgp-1.2) CD45.1 ou CD45.2 (Ly5.1 ou Ly5.2) ou encore CD90.1 ou CD90.2 (Thy1.1 ou Thy1.2). Ces allotypes sont à priori non immunogènes. La persistance de cellules portant un marqueur allotypique permet d'évaluer la localisation, le nombre et la durée de vie d'une population dans des receveurs portant un allotype distinct. Cependant, cette technique ne permet pas de discriminer entre survie périphérique de cellules à longue durée de vie et persistance de clonotypes par multiplication à la périphérie. Le nombre de cellules transférées est limité par le volume injectable et ne peut en aucun cas être comparé à la production physiologique. D'autre part, nous verrons que le devenir des cellules est dépendant du statut du receveur (immunocompétent ou immunodéficient).

Les marquages à la  $^3\text{H}$ T ou au BrdU ou encore le transfert de cellules avec un marqueur allotypique particulier, ne permettent pas de suivre les divisions au niveau de chaque cellule. Aussi, des fluorochromes comme le FITC, la PKH ou le CFSE ((Lyons and Parish 1994)) sont maintenant utilisés pour suivre les divisions cellulaires. Ces colorants s'intercalent dans la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique (FITC, PKH) ou fixent les protéines cytoplasmiques par estérification (CFSE). Les marquages des cellules s'effectuent en général *ex vivo*, mais des études sont à présent menées après marquage *in vivo* par injection directe du fluorochrome (Graziano, St-Pierre et al. 1998). En ce qui concerne les cellules marquées au CFSE, elles peuvent être suivies *in vivo* pendant plusieurs semaines. Les



activités biologiques et prolifératives des cellules ne semblent pas altérées par l'incorporation du fluorochrome. Le marquage semble être stable sur les cellules, mais la possibilité d'un transfert de cellules à cellules par contact doit être prise en compte pour les études à long terme. Enfin, les marquages trop intenses doivent être évités, car ils aboutissent à une perte de l'intégrité membranaire et à une mortalité cellulaire accrue.

#### *g. Arrêt ou limitation de la production centrale*

La machinerie de recombinaison des gènes du TCR et l'expression d'un TCR à la surface des thymocytes sont des facteurs cruciaux pour la thymopoïèse. Aussi, nous avons vu plus haut que la mutation des gènes impliqués dans la recombinaison ou encore dans le complexe TCR entraîne un blocage de la thymopoïèse à des stades plus ou moins tardifs. L'utilisation de souris déficientes pour ces molécules permet, à travers des expériences de chimères mixtes compétitives, de réduire le nombre de précurseurs thymiques capables de générer des LyT en périphérie. Le contrôle homéostatique du nombre de cellules T périphériques reflète un état d'équilibre du système dans lequel la taille des populations est constante en condition physiologique (pour revue Tanchot, Rosado et al. 1997). Cela implique que la production cellulaire compense la disparition de cellules périphériques. D'un point de vue théorique, l'abrogation ou encore la limitation de la production thymique doit modifier les propriétés des LyT. La critique majeure que l'on peut donc faire aux expériences bloquant la production médullaire est de modifier probablement de façon artificielle la durée de vie et/ou peut-être la nature des LyT périphériques.

### **3. Mise en évidence du contrôle homéostatique des lymphocytes T périphériques**

Nous chercherons ici, à dresser un tableau des déterminants moléculaires et cellulaires qui contrôlent l'homéostasie lymphocytaire T. L'hétérogénéité des LyT a conduit à considérer spécifiquement cette dynamique et son contrôle pour les différentes sous-populations de LyT. Au sein des LyT, on distinguera les lymphocytes  $T\alpha\beta$   $CD4^+$  ou  $CD8^+$  naïfs, les lymphocytes  $T\alpha\beta$   $CD4^+$  ou  $CD8^+$  mémoires, les lymphocytes  $T\alpha\beta$   $CD4^+$  régulateurs, les lymphocytes  $T\gamma\delta$  et les lymphocytes NK-T. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux lymphocytes  $T\alpha\beta$  naïfs, mémoires ou régulateurs. L'ensemble de ces sous-populations lymphocytaires est

défini selon l'expression de marqueurs de surface (Cf tableau 1.3). Nous verrons que ces populations ont un comportement dynamique distinct. Par ailleurs, nous préciserons les différents mécanismes qui peuvent moduler cette dynamique.

Lymphocyte CD4 <sup>+</sup>	Marqueur	Molécule	Fonction(s)	LyT Naïf	LyT Mémoire	Treg
	CD25	IL-2R $\alpha$	Activation/Prolifération	-	-	++
	CD44	Protéoglycane	Activation/Adhésion	+	++	++
	CD45RB	Tyrosine PPase	Activation	+++	+	+
	CD62L	L-Selectine	Adhésion	+++	+	+
	CD69	C-lectine	Co-stimulation	-	-	- / + (*)
	CD122	IL-2/15R $\beta$	Activation/Prolif./Survie	-	- / + (*)	+
	CD127	IL-7R $\alpha$	Activation/Prolif./Survie	+	+	- / +
	CD132	chaîne $\gamma$ c	Activation/Prolif./Survie	+	+	+
Lymphocyte CD8 <sup>+</sup>	Marqueur	Molécule	Fonction(s)	LyT Naïf	LyT Mémoire	
	CD25	IL-2R $\alpha$	Activation/Prolifération	-	-	
	CD44	Protéoglycane	Activation/Adhésion	+	++	
	CD45RB	Tyrosine PPase	Activation	+++	+	
	CD62L	L-Selectine	Adhésion	+++	+	
	CD69	C-lectine	Co-stimulation	-	-	
	CD122	IL-2/15R $\beta$	Activation/Prolif./Survie	+	- / ++ (*)	
	CD127	IL-7R $\alpha$	Activation/Prolif./Survie	+	+	
	CD132	chaîne $\gamma$ c	Activation/Prolif./Survie	++	++	

**Tableau 1.3 :** Propriétés phénotypiques des LyT CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> de type naïf, mémoire ou régulateur. Le niveau d'expression des marqueurs est symbolisé par les +, le symbole \* signifie qu'il existe deux populations distinctes.

Plusieurs observations expérimentales datant d'une vingtaine d'années ont fait état d'une régulation homéostatique du compartiment lymphocytaire T. Ces expériences sont basées sur les effets de la thymectomie, de greffe de thymus ou encore du vieillissement sur le compartiment de LyT périphériques.

♦ Les expériences menées par Miller ont montré qu'après des thymectomies menées chez les souris adultes, les animaux étaient capables de maintenir un compartiment lymphocytaire T périphérique plusieurs mois après la chirurgie même si celui-ci présentait une petite réduction de sa taille (Miller 1979). Les thymectomies réalisées juste après la naissance (avant jour 3) induisent un déficit lymphocytaire T important mais aussi le développement de pathologies

auto-immunes (Itoh, Takahashi et al. 1999; Dujardin, Burlen-Defranoux et al. 2004). A l'inverse, en complément aux travaux de Miller, la greffe de dizaines de thymus ne provoque pas une augmentation conséquente du nombre de LyT périphériques (Metcalf 1960; Wallis, Leuchars et al. 1979; Berzins, Godfrey et al. 1999).

♦ Au cours du vieillissement, le thymus subit une involution caractérisée par des modifications histologiques avec baisse de la cellularité, par le remplacement des structures corticales et médullaires par du tissu adipeux et il y'a aussi une baisse de la thymopoïèse (pour revue Aspinall and Andrew 2000). Ceci entraîne une réduction significative de l'export thymique. Cependant le pool de LyT périphériques est efficacement maintenu sans doute par des mécanismes d'expansion périphérique.

♦ Des expériences conduites ultérieurement ont permis d'expliquer ces observations. Les pathologies auto-immunes observées après thymectomie en période néonatale, ont été expliquées plus tard par Shimon Sakaguchi, en montrant que des LyT  $CD4^+CD25^+$  générés par le thymus n'avaient pas le temps de s'implanter en périphérie (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Après transferts adoptifs, cette population présentait la propriété de prévenir des pathologies auto-immunes qui pouvaient être développées. Plus tard, la caractérisation des cellules  $CD4^+CD25^+$  a constitué les prémices de la biologie des cellules T régulatrices (Treg) et la renaissance du concept de cellules T suppressives abandonné plus tôt (pour revue Shevach 2002; Sakaguchi 2004).

♦ Les expériences menées sur des souris irradiées létalement et reconstituées avec de la moelle osseuse contenant un mélange de précurseurs immunocompétents (moelle osseuse sauvage) et incompétents (moelle osseuse  $TCR\alpha^{-/-}$ ) permettent de limiter la production thymique et d'étudier les effets sur la population T périphérique (Almeida, Borghans et al. 2001). Ces expériences ont permis de démontrer qu'une réduction de la thymopoïèse à hauteur de 90% (chimères reconstituées avec 90% de moelle osseuse  $TCR\alpha^{-/-}$  et 10% sauvage) n'affectait pas la taille de la population de LyT périphérique. Celle-ci reste comparable à celle des souris contrôles (chimères reconstituées avec 100% de moelle osseuse sauvage). En dessous de cette proportion minimale de précurseurs immunocompétents, on constate une baisse drastique du nombre de LyT périphériques mais aussi une modification

phénotypique importante des cellules T présentes. Les LyT présentent majoritairement un phénotype activé (CD45RB<sup>low</sup>).

Il apparaît donc au vu de ces résultats que le thymus produit un nombre de LyT plus important qu'il n'est nécessaire parce qu'un nombre stable de cellules T périphériques est activement maintenu par des mécanismes homéostatiques dans des conditions où la production thymique est normale ou défectueuse. L'augmentation de la survie des cellules périphériques et leur activité de prolifération (homéostatique ici) contribuent principalement à maintenir l'homéostasie lymphocytaire T. A partir des données de la littérature, nous discuterons ici des facteurs principaux responsables de la survie et de la prolifération homéostatique des LyT.

#### **4. Déterminants moléculaires de l'homéostasie des LyT $\alpha\beta$**

##### *a. L'interaction TCR/CMH est importante pour les LyT naïfs*

La survie et la prolifération homéostatique des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> naïves dépendent de l'expression des molécules de CMH II et I respectivement. Ces molécules exprimées dans le thymus sont responsables de la sélection positive des thymocytes et doivent être à nouveau présentes en périphérie pour assurer la survie et la prolifération des LyT (Ernst, Lee et al. 1999; Goldrath and Bevan 1999; Viret, Wong et al. 1999). Les auteurs qui ont observé cet effet parlent même d'une « sélection positive périphérique » sur la base de la reconnaissance des mêmes complexes CMH-pAg qui sont responsables de la sélection positive au niveau du thymus. En effet, le transfert de cellules T polyclonales ou monoclonales (TCR-Tg restreint pour une classe de CMH particulier) dans des receveurs lymphopéniques et déficients pour le CMH I ou II n'autorise pas la prolifération des lymphocytes transférés. Les LyT disparaissent même après quelques jours. Considérant que les interactions TCR/CMH sont indispensables à la survie des LyT en périphérie, des travaux ont été entrepris pour évaluer le taux de demi-vie des lymphocytes en l'absence de TCR. Ainsi, la délétion conditionnelle du gène de la chaîne  $\alpha$  du TCR par un traitement à la tétracycline provoque la disparition rapide de l'expression du TCR $\alpha\beta$  à la surface des thymocytes et lymphocytes T périphériques (Labrecque, Whitfield et al. 2001; Polic, Kunkel

et al. 2001). L'absence d'expression du  $\text{TCR}\alpha\beta$  conduit à un blocage de la différenciation au stade DP et autorise l'évaluation de la demi-vie des LyT périphériques. Ainsi, il a été montré que la demi-vie des populations  $\text{CD4}^+$  et  $\text{CD8}^+$  était de 27 et 19 jours respectivement. Les mêmes conclusions avec des valeurs sensiblement identiques ont pu être tirées avec des expériences de transferts adoptifs dans des souris  $\text{CMH}^{-/-}$  (Tanchot, Lemonnier et al. 1997; Murali-Krishna, Lau et al. 1999; Swain, Hu et al. 1999).

*b. L'interaction TCR/CMH est moins importante pour les LyT mémoires*

Il est communément admis que les populations  $\text{CD4}^+\text{CD44}^{\text{High}}$  et  $\text{CD8}^+\text{CD44}^{\text{High}}$  sont enrichies en LyT mémoires, les LyT naïfs étant  $\text{CD44}^{\text{Low}}$ . De plus, il a été montré que la dynamique des LyT en fonction de l'expression du marqueur CD44 présentait une dichotomie claire (Tough and Sprent 1994). Les cellules T naïves se divisent peu et présentent une activité métabolique faible alors que les cellules T mémoires se divisent plus rapidement et ont une activité métabolique plus forte. Cela impliquait très tôt que les cellules naïves et mémoires sont soumises à un contrôle homéostatique différent.

Les facteurs qui régulent le maintien du compartiment de LyT mémoires semblent donc être moins astringents que pour les LyT naïfs. En effet, dans le cas des cellules T mémoires  $\text{CD4}^+$  ou  $\text{CD8}^+$  après transfert adoptif dans des receveurs lymphopéniques et/ou déficients pour les molécules de CMH I ou II, les cellules transférées ont la capacité de persister mais se divisent pas ou peu (Tanchot, Lemonnier et al. 1997; Murali-Krishna, Lau et al. 1999; Swain, Hu et al. 1999). On constate donc une réduction logique de leur nombre et on peut supposer que seules certaines sous-populations de LyT mémoires sont ainsi préservées. De manière logique, il a été montré que la présence de l'antigène responsable de la sélection positive de ces lymphocytes n'est pas nécessaire à leur maintien en périphérie. Il persiste cependant une controverse quand à la nature des signaux qui maintiennent la survie des LyT mémoires. D'autant plus que l'approche de délétion conditionnelle du TCR des LyT  $\text{CD8}^+$  mémoires conduit avec le temps à la disparition de cette population mais ceci n'est pas vérifié pour les LyT  $\text{CD4}^+$  mémoires. Cependant il faut noter que la fonctionnalité des cellules mémoires peut être modifiée en absence de contact TCR/CMH. Des travaux portant sur les LyT  $\text{CD4}^+$  mémoires ont montré que ces cellules avaient perdu leur capacité à répondre à leur antigène nominal *in vivo* et ne pouvaient plus monter une réponse immunitaire efficace (Kassiotis, Garcia et al. 2002). Les interactions TCR/CMH ne sont donc peut être pas

nécessaires à l'homéostasie des cellules T mémoires mais elles semblent être impliquées dans le maintien de la fonction des LyT mémoires.

L'importance des interactions TCR/CMH soulève certaines questions. La nature des cellules qui présentent le CMH, la nature de l'antigène qui lui est associé et enfin son utilité sont des sources d'interrogation. Des travaux récents ont apporté quelques éléments de réponses à ces questions. *In vitro*, seules les cellules dendritiques sont capables de déclencher la prolifération homéostatique, les autres cellules présentatrices du système immunitaire (cellule B et monocyte/macrophage) n'ont pas cette capacité (Ge, Palliser et al. 2002). *In vivo*, les travaux du groupe de Brocker ont validé les résultats précédents (Brocker 1997; Kirberg, von Boehmer et al. 2001; Gruber and Brocker 2005). En effet, lorsque seules les cellules dendritiques sont capables d'exprimer le CMH I, grâce aux croisements de souris transgéniques exprimant la chaîne  $\beta 2\text{-m}$  sous le promoteur CD11c avec des souris  $\beta 2\text{-m}^{-/-}$ , la prolifération homéostatique des LyT CD8<sup>+</sup> naïfs et leur accumulation dans des receveurs lymphopéniques après transferts adoptifs sont possibles. Ces résultats semblent suggérer que les cellules dendritiques soient suffisantes pour fournir un signal de survie et prolifération aux lymphocytes T naïfs. Néanmoins, la possibilité que d'autres cellules exprimant le CMH soit importante pour entretenir la prolifération homéostatique des LyT (potentiellement toutes les cellules de l'organisme) n'a pas été prise en compte, partant du fait que la prolifération homéostatique a lieu dans les organes lymphoïdes, ce qui n'est pas pour l'heure clairement établi.

### *c. Quelle est la nature du peptide présenté aux LyT naïfs par le CMH ?*

La nature des interactions TCR/CMH pour assurer l'homéostasie des LyT naïfs semble nécessiter une reconnaissance par le TCR de faible affinité du complexe CMH associé aux peptides du soi (CMH-pAg). Cependant, il n'y pas réellement un consensus sur l'idée que les peptides impliqués dans la sélection positive soient les mêmes que ceux qui assurent la survie et la prolifération des LyT en périphérie. A partir d'expériences de transferts adoptifs après injection d'un peptide antagoniste issu de l'ovalbumine et connu pour soutenir la sélection positive des LyT TCR-Tg OT-1, la prolifération homéostatique a lieu (Goldrath and Bevan 1999). Au contraire, un peptide agoniste déclenche une activation caractérisée par une dilution très rapide du CFSE, des modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules OT-1. Celles-ci passent de l'état naïf (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup> CD49d<sup>-</sup> CD62L<sup>++</sup>) à l'état activé (CD44<sup>++</sup>

CD25<sup>+</sup> CD49d<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>) et présentent des propriétés cytotoxiques importantes. Des conclusions similaires ont été obtenues pour les LyT CD4<sup>+</sup> après transfert dans des souris H-2M<sup>-/-</sup> irradiées (Viret, Wong et al. 1999). Dans ce modèle de receveur, la sous-unité  $\alpha$  de l'hétérodimère H-2M $\alpha\beta$  est absente, or celle-ci est capitale pour le chargement de peptide antigénique sur les molécules de CMH II. C'est pourquoi, les CPA expriment de manière quasi-unique le peptide CLIP chargé sur le CMH II de type I-A<sup>b</sup> (Riberdy, Newcomb et al. 1992; Sette, Ceman et al. 1992). Dans ces souris, les LyT polyclonaux CD4<sup>+</sup> transférés ne prolifèrent pas. A l'inverse, les cellules CD4<sup>+</sup> issues de la souris H-2M<sup>-/-</sup> (donc sélectionnées positivement sur la base de la reconnaissance du complexe I-A<sup>b</sup>-pCLIP) prolifèrent, alors que ces mêmes cellules ne prolifèrent pas dans un receveur I-A<sup>b/-</sup>. L'ensemble de ces travaux permet de conclure que la persistance et le renouvellement périphérique des LyT sont contrôlés par une reconnaissance spécifique des peptides du soi au niveau des organes lymphoïdes.

L'hypothèse attractive d'un système de maintien d'un répertoire large de cellules T naïves sur la base de ce mode de contrôle de la prolifération homéostatique a été mise en avant. Cependant, il semblerait à travers les travaux élégants développés par les groupes de Charles Surh (Kieper, Troy et al. 2005) et Dennis Kasper (Mazmanian, Liu et al. 2005) que certains antigènes du non soi puissent aussi alimenter les mécanismes de contrôle de la prolifération homéostatique. En effet, les bactéries de la flore intestinale sont à l'origine d'une prolifération rapide des LyT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> après transfert adoptif dans des souris immunodéficientes. Cette prolifération importante et rapide n'est pas ou peu observée chez des souris sauvages irradiées avant transfert ou encore chez des souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) élevées en conditions d'absence totale de pathogènes. Pour les LyT CD4<sup>+</sup>, il semblerait qu'un antigène bactérien issu de *b. fragilis*, le PSA (PolySaccharide A) soit reconnu et présenté au niveau des molécules de CMH II des cellules dendritiques du tractus gastro-intestinal. Les DC sont alors activées, migrent au niveau des organes lymphoïdes secondaires et entraînent une expansion des cellules T CD4<sup>+</sup> d'environ 50% de manière cytokine dépendante. Cependant, l'importance de ce phénomène n'est pas encore clairement établi, et la nature des LyT CD4<sup>+</sup> qui se sont multipliés n'a pas été caractérisée. Aucun mécanisme similaire n'a été rapporté pour les LyT CD8<sup>+</sup>.

Le fait que les interactions TCR/CMH ne soient pas requises dans le cas des cellules mémoires implique que la reconnaissance de leur peptide n'est pas nécessaire. Ceci est peut être dû à une sensibilité plus importante à d'autres facteurs comme par exemple les cytokines, pour assurer leur renouvellement et/ou leur maintien. D'autant plus que certaines chaînes des récepteurs membranaires aux cytokines sont exprimées spécifiquement ou de façon plus importante par les LyT mémoires (Cf tableau 1.3). C'est ce que nous aborderons dans la partie suivante.

*d. Les interleukines sont impliquées dans l'homéostasie des LyT $\alpha\beta$*

Les interleukines sont des cytokines, une catégorie de facteurs protéiques solubles induits par de très nombreux stimuli et produits par de très nombreux types cellulaires. Elles permettent un dialogue entre les cellules, régulent les phénomènes de survie, prolifération, différenciation, activation et mort des cellules du système immunitaire. Elles sont donc naturellement importantes dans le déroulement d'une réponse inflammatoire et immunitaire mais aussi dans le contrôle homéostatique du système immunitaire. Une cytokine donnée agit sur différentes cellules cibles, et son action ou sa production peuvent être modulées par d'autres cytokines. Les effets biologiques d'une cytokine peuvent varier selon la cible et sont souvent multiples, tandis que plusieurs cytokines peuvent exercer le même effet sur une cible donnée. Ces deux propriétés, pléiotropie et redondance ainsi que le nombre très élevé connu à ce jour de ces molécules (> 100) génèrent un système d'interactions en réseau très complexe.

L'explication des notions de pléiotropie et redondance et par conséquent la spécificité de certains effets a été déplacée au niveau des récepteurs aux cytokines. En effet, ces récepteurs sont composés de plusieurs sous-unités qui peuvent être partagées entre les cytokines. Dans le système immunitaire, les LyT expriment de façon différentielle ou partagent certaines chaînes réceptrices à une ou plusieurs cytokines. Les voies de signalisation en aval de ces récepteurs commencent à être décortiquées pour comprendre le ou les rôles d'une cytokine donnée.

Nous évoquerons dans cette sous-partie les cytokines impliquées dans l'homéostasie lymphocytaire. C'est principalement l'interleukine-7 et -15 (IL-7 et IL-15) qui contrôlent la survie et la prolifération homéostatique des LyT avec des effets caractéristiques selon les sous-populations CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> naïves et mémoires. Nous nous concentrerons donc



principalement sur les rôles de ces deux interleukines. Toutefois les effets de certaines autres cytokines ont été décrits, mais leurs actions s'avèrent, à l'heure actuelle, moins importantes (Cf tableau 1.2). De plus, il semblerait aussi qu'une nouvelle cytokine  $\gamma$ c-dépendante avec une activité sur la prolifération homéostatique des LyT existe, mais ne soit pas encore identifiée (Kamimura, Ueda et al. 2004).

- **Le cas des cellules naïves : un mariage avec l'IL-7**

Ce n'est que récemment qu'il a été admis que la reconnaissance des complexes CMH-pAg par les TCR n'était pas suffisante pour maintenir les LyT naïfs périphériques en vie. Différents constats expérimentaux ont conduit à identifier et caractériser l'IL-7 comme cytokine majeure dans le contrôle de l'homéostasie lymphocytaire des LyT naïfs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. En effet, après un transfert adoptif dans des souris IL-7<sup>-/-</sup>, les LyT naïfs disparaissent après 2 à 3 semaines malgré la persistance des contacts TCR/CMH (Schluns, Kieper et al. 2000; Tan, Dudl et al. 2001). La survie et la prolifération homéostatique des LyT naïfs nécessitent donc au moins deux signaux : l'un via le TCR par l'interaction TCR/CMH et l'autre via l'IL-7R à condition que l'IL-7 soit produite ou du moins présente dans les organes lymphoïdes. Ceci implique que l'excès de l'un voire de ces deux signaux entraîne une perturbation de l'homéostasie lymphocytaire. En effet, dans des systèmes de transferts adoptifs où les souris receveuses sont lymphopéniques (Rag<sup>-/-</sup>, CD3<sup>-/-</sup>...), l'IL-7 est vraisemblablement produite en excès (Li, Huston et al. 2003). C'est pourquoi la prolifération des LyT transférés est importante. Logiquement, lorsque le transfert est réalisé dans des souris sauvage où le nombre de lymphocytes présents est important et en équilibre, les LyT transférés ne prolifèrent pas et on observe la même chose lorsqu'on transfère un grand nombre de LyT dans une souris lymphopénique (pour revue Stockinger, Barthlott et al. 2004). L'hypothèse qui découle de ces résultats est que les LyT naïfs sont en compétition pour une ressource commune : l'IL-7. Cette ressource est à l'origine du contrôle de l'équilibre de la population de LyT naïfs dans un organisme. Des preuves supplémentaires sont venues étayer cette hypothèse. Par exemple, l'injection d'anticorps bloquant dirigés contre l'IL-7 ou la chaîne  $\alpha$  de son récepteur n'autorise plus la prolifération homéostatique des LyT dans des modèles de transferts adoptifs (pour revue Fry and Mackall 2002). D'autre part, la caractérisation des différents modèles de souris IL-7 Tg montre bien des perturbations

homéostatiques du compartiment LyT (El Kassar, Lucas et al. 2004). Dans chacun de ces modèles, la différenciation thymique n'est pas ou très peu affectée si bien que l'augmentation drastique du nombre de LyT périphériques reflète une altération du contrôle homéostatique périphérique des LyT.

Il est intéressant de noter que quelque soit le contexte expérimental, les cellules T polyclonales naïves CD8<sup>+</sup> prolifèrent plus que les CD4<sup>+</sup> *in vitro* ou *in vivo* après transfert adoptif malgré un niveau d'expression de l'IL-7R comparable entre les deux populations. Les LyT CD8<sup>+</sup> naïfs pourraient donc avoir des propriétés intrinsèques plus propices à la prolifération homéostatique, autorisant un seuil de détection plus faible du niveau d'IL-7 disponible. Des modifications de la signalisation en aval du récepteur à l'IL-7 ou la synergie des signaux entre le complexe TCR et l'IL-7R pourraient être à l'origine de ce phénomène mais ceci n'est pas encore établi.

- **Le cas des cellules mémoire : adultère des LyT CD8<sup>+</sup> avec l'IL-15**

La survie et la prolifération homéostatique des LyT mémoires semblent indépendantes des contacts TCR/CMH. Par conséquent, l'homéostasie du compartiment lymphocytaire T mémoire doit être principalement sous le contrôle des cytokines. Cela nécessite que les LyT mémoires expriment les récepteurs de ces cytokines. C'est en effet une des propriétés phénotypiques des LyT mémoires (Cf tableau 1.3). Il est communément admis que les populations CD4<sup>+</sup>CD44<sup>High</sup> et CD8<sup>+</sup>CD44<sup>High</sup> sont enrichies en LyT mémoires (Tough and Sprent 1994), or parmi ces cellules une large proportion exprime de manière constitutive les chaînes du récepteur à l'IL-7 (IL-7R $\alpha$  et  $\gamma$ c) pour les cellules CD4<sup>+</sup> et celles du récepteur à l'IL-15 (IL-15R $\alpha$ , IL-2/15R $\beta$  et  $\gamma$ c) pour les cellules CD8<sup>+</sup> (Tan, Ernst et al. 2002). L'importance de l'IL-15 pour l'homéostasie des LyT CD8<sup>+</sup> mémoires a été décrite la première et récemment le rôle de l'IL-7 pour l'homéostasie des LyT CD4<sup>+</sup> mémoires a aussi été documenté (Zhang, Sun et al. 1998; Kaech, Tan et al. 2003; Kondrack, Harbertson et al. 2003; Li, Huston et al. 2003; Seddon, Tomlinson et al. 2003; Lenz, Kurz et al. 2004).

#### □ Les cellules CD4<sup>+</sup>CD44<sup>High</sup>

Initialement, le rôle de l'IL-7 ou plus généralement celui des cytokines signalant par la chaîne  $\gamma\text{c}$  ne semblait pas important pour l'homéostasie des cellules T mémoires contrairement aux cellules T naïves. En effet, les LyT TCR-Tg. $\gamma\text{c}^{-/-}$  sont capables de proliférer et de se maintenir après transfert adoptif (Lantz, Grandjean et al. 2000). De plus, le transfert de LyT polyclonaux CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> dans des receveurs lymphopéniques IL-7<sup>-/-</sup> ou IL-15<sup>-/-</sup> autorise leur prolifération. Ceci semblait assez surprenant sachant que ces cellules expriment l'IL-7R $\alpha$  et IL-2/15R $\beta$  (Tan, Ernst et al. 2002). Une des critiques qui a été faite à ces études, est que les LyT CD4<sup>+</sup>CD44<sup>High</sup> présentant une forte activité de prolifération ne représentaient pas forcément les LyT mémoires retrouvés dans une souris non manipulée, c'est à dire ceux qui ont été en contact avec un antigène du non-soi et qui sont capables de répondre plus rapidement après une nouvelle stimulation par cet antigène. Aussi, des travaux plus récents utilisant des approches différentes ont pu démontrer l'importance de l'IL-7 dans l'homéostasie des LyT CD4<sup>+</sup> mémoires principalement à travers la régulation de leur survie (Kondrack, Harbertson et al. 2003; Li, Huston et al. 2003). En effet, les LyT CD4<sup>+</sup> mémoires générés après immunisation des souris TCR-Tg OT-II avec de l'ovalbumine nécessitent l'IL-7 pour se maintenir après transfert adoptif dans un receveur immunodéficient. Les auteurs de ces travaux montrent aussi que l'injection d'un anticorps anti-IL-7R $\alpha$  provoque une disparition rapide des ces LyT CD4<sup>+</sup>CD44<sup>High</sup> OT-II. Les mêmes conclusions ont été tirées à travers d'autres études qui révèlent en plus que l'IL-7 contrôle la survie et la prolifération basale de LyT CD4<sup>+</sup> mémoires monoclonaux ou polyclonaux et même lorsque la voie de signalisation en aval du TCR est abolie de manière inductible (Seddon and Zamoyska 2002; Seddon, Tomlinson et al. 2003).

Malgré ces résultats, de nombreux points sont encore à éclaircir. Il semble que la définition même des cellules mémoires d'un point de vue uniquement phénotypique semble introduire un biais dans notre compréhension de ce qui régule la prolifération et la survie de ce compartiment. D'autant plus que de nombreuses évidences témoignent aujourd'hui de l'hétérogénéité de cette population (Kassiotis and Stockinger 2004) et que les cellules T naïves qui sont transférées dans des receveurs immunodéficients adoptent aussi très rapidement un phénotype mémoire (pour revue Ge, Hu et al. 2002). Aussi, ces deux éléments peuvent biaiser de manière artéfactuelle l'interprétation des résultats obtenus.

#### □ Les cellules CD8<sup>+</sup>CD44<sup>High</sup>

Très tôt il a été suggéré que l'IL-15 régulaient l'homéostasie des LyT CD8<sup>+</sup> mémoires. Ceci principalement à travers les travaux du groupe de Jonathan Sprent, qui ont montré que certains stimuli sur des CPA (immunisation de souris avec du poly I:C) provoquaient une prolifération importante des LyT CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> de manière TCR indépendante (Tough, Sun et al. 1997; Zhang, Sun et al. 1998). Ce phénomène était IFN $\gamma$ -dépendant parce qu'il n'était pas possible de le reproduire après immunisation de souris IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Mais *in vitro*, une stimulation directe des LyT mémoires par l'IFN $\gamma$ , n'entraîne pas leur expansion. Donc, le rôle de l'IFN $\gamma$  n'est pas direct. Le terme « effet bystander » a été utilisé pour décrire ce phénomène. En fait, une autre molécule semblait prendre le relais. Sachant que les LyT mémoires CD8<sup>+</sup> expriment les composants du récepteur à l'IL-15 et que cette cytokine est exprimée par certaines CPA après une stimulation à l'IFN $\gamma$  (Zhang, Sun et al. 1998). Cela faisait de l'IL-15 une candidate idéale pour réguler l'homéostasie des cellules T mémoires CD8<sup>+</sup>. Par la suite, les mêmes expériences conduites chez des souris IL-15<sup>-/-</sup> ont montré la disparition de l'effet bystander alors que la stimulation directe *in vitro* de cellules T par l'IL-15 a révélé une réponse proliférative préférentielle des LyT CD8<sup>+</sup> mémoires et pas naïfs (Judge, Zhang et al. 2002). Les mêmes conclusions ont pu être tirées *in vivo*. Les souris IL-15<sup>-/-</sup> présentent une réduction sélective de la population CD8<sup>+</sup>CD44<sup>High</sup>. De manière analogue, cette population disparaît de façon sélective avec le temps suite à un transfert adoptif chez une souris lymphopénique IL-15<sup>-/-</sup>. Il est intéressant de noter qu'au sein des LyT CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> environ 70% sont IL2/15R $\beta$ <sup>+</sup> et c'est cette population uniquement qui répond à l'IL-15. A l'inverse, la population CD8<sup>+</sup>CD44<sup>High</sup>IL2/15R $\beta$ <sup>-</sup> semble réagir à des contrôles IL-15-indépendants. Cette population devient même majoritaire et persiste chez les souris IL-15<sup>-/-</sup> après transfert adoptif (Judge, Zhang et al. 2002; Tan, Ernst et al. 2002).

Comme les cellules CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> expriment aussi la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7 (Tan, Ernst et al. 2002), il est légitime de penser que l'IL-7 peut aussi contrôler l'homéostasie des LyT CD8<sup>+</sup> mémoires de manière soit synergique ou redondante avec l'IL-15. La production d'IL-7 étant à priori normale chez les animaux IL-15<sup>-/-</sup>, et ces animaux présentant une réduction drastique des LyT mémoires CD8<sup>+</sup>, le rôle de l'IL-7 a été mis de côté un certain temps. Cependant, il est possible d'imaginer que le taux d'IL-7 nécessaire pour assurer la survie et la prolifération des LyT CD8<sup>+</sup> mémoires soit plus important que pour les cellules

naïves. Cette hypothèse a pu être validée par le croisement des animaux IL-15<sup>-/-</sup> avec les animaux IL-7 Tg (Kieper, Tan et al. 2002). Dans cette situation où l'IL-7 est exprimée en excès, la population mémoire CD8<sup>+</sup> est restaurée à un niveau normal malgré l'absence de l'IL-15 que ce soit pour les cellules CD8<sup>+</sup>CD44<sup>High</sup> en général ou les cellules CD8<sup>+</sup>CD44<sup>High</sup>IL2/15Rβ<sup>+</sup> en particulier. La surproduction de l'IL-7 permet donc d'assurer la prolifération et la survie des LyT CD8<sup>+</sup> mémoires transférés dans des receveurs lymphopéniques IL-15<sup>-/-</sup>. A l'inverse, dans des receveurs IL-7<sup>-/-</sup>.IL-15<sup>-/-</sup> la prolifération et la persistance des cellules CD8<sup>+</sup> mémoires transférées sont impossibles.

En conclusion, l'homéostasie des LyT CD8<sup>+</sup> mémoires est majoritairement dépendante de la production d'IL-15. Cependant, d'autres facteurs et notamment des cytokines comme l'IL-7 sont impliqués. Les niveaux d'expression nécessaires sont simplement différents. Le contrôle de l'expression de ces cytokines, la localisation de leurs sites de production et leurs concentrations locales sont sûrement des paramètres importants à considérer à l'avenir.

## **5. Déterminant cellulaire de l'homéostasie des LyTαβ : contributions des Treg**

### *a. Généralités sur les Treg*

Les étapes de sélection thymique assurent la génération de LyT tolérants au soi. On parle de mécanismes de tolérance centrale. Ils assurent l'élimination de la majorité des LyT autoréactifs. Cependant, certains d'entre eux échappent aux processus de sélection et gagnent la périphérie. La gestion de ces LyT autoréactifs est alors assurée par des mécanismes de tolérance dits périphériques. Parmi les mécanismes de tolérance périphérique, on distingue les mécanismes de tolérance dits intrinsèques ou extrinsèques. La délétion clonale ou encore l'anergie des cellules autoréactives constituent des mécanismes intrinsèques de tolérance périphérique assurant l'élimination ou l'absence de réponse des cellules autoréactives (pour revue Palmer 2003). Mais, ceci n'est pas suffisant. Il y'a dix ans une sous-population de LyT CD4<sup>+</sup> présentant des propriétés de prévention contre les pathologies auto-immunes a été identifiée (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). On parle de lymphocytes T régulateurs (Treg). Ces Treg constituent le principal mécanisme de tolérance extrinsèque. Les Treg sont générés par le thymus sur la base d'une affinité plus importante aux Ag du soi à partir de cellules DP

(pour revue Kronenberg and Rudensky 2005). Les Treg ne sont pas capables de synthétiser l'IL-2 mais expriment constitutivement la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25 ou IL-2R $\alpha$ ), ainsi que d'autres marqueurs phénotypiques caractéristiques, (CD5<sup>high</sup>, CD45RB<sup>low</sup>, GITR<sup>+</sup>, CTLA4<sup>+</sup>...) et surtout elles expriment spécifiquement le facteur de transcription FOXP3. D'un point de vue fonctionnel, ces cellules sont anergiques et suppressives. En effet, elles ne répondent pas aux stimuli d'activation *in vitro* bien qu'elles puissent proliférer *in vivo*, et *in vitro* ou *in vivo* elles limitent la prolifération des autres LyT stimulés. La suppression est dépendante de l'expression du FT FOXP3 par les Treg et du contact entre les Treg et les LyT conventionnels (pour revue Sakaguchi 2004).

### *b. Homéostasie des Treg*

Les Treg représentent environ 5-10% des LyT CD4<sup>+</sup>. Cette proportion est très stable dans les organes lymphoïdes périphériques principaux (rate et ganglions lymphatiques). Jusqu'à présent peu de travaux se sont intéressés à l'homéostasie de cette sous population de LyT CD4<sup>+</sup>. Leur faible nombre rend difficile les expériences de transferts adoptifs. Cependant un ensemble de travaux récents permet de dresser un premier aperçu des éléments de contrôle de l'homéostasie des Treg.

♦ L'IL-2 est cruciale pour la prolifération et la survie périphérique des Treg mais pas pour leur développement thymique. En effet les souris IL-2<sup>-/-</sup>, génèrent des Treg mais en nombre réduit. En absence d'IL-2, les Treg ne sont pas maintenus en périphérie et ces souris développent des pathologies auto-immunes en vieillissant (pour revue Malek 2003; Malek and Bayer 2004). Les mêmes résultats peuvent être obtenus par injection d'Ac anti-IL-2 dans des souris sauvages (Bayer, Yu et al. 2005; Setoguchi, Hori et al. 2005). *In vivo*, la source la plus probable d'IL-2 serait les autres LyT. Les LyT synthétisent de l'IL-2 en grande quantité après activation mais aussi en plus faible quantité au cours de la prolifération homéostatique (Curotto de Lafaille, Lino et al. 2004). On aurait en quelque sorte un système coordonné entre les LyT et les Treg pour autoriser, limiter ou stopper la prolifération lymphocytaire en fonction de l'IL-2 disponible et ceci aussi bien au cours d'une réponse immune qu'au cours de la prolifération homéostatique.

♦ Les antigènes du soi ayant assuré la sélection et la génération des Treg au niveau du thymus continuent de maintenir une sélection périphérique de ces cellules et de manière beaucoup plus stricte que pour les autres LyT (pour revue Cozzo, Lerman et al. 2005). Les souris TS1 sont des souris TCR-Tg (clonotype 6.5) spécifique du peptide S1 de l'hémagglutinine (HA) du virus de l'influenza. Lorsque ces souris sont croisées avec des souris HA-Tg, on observe une large proportion de thymocytes  $CD4^+CD8^+CD25^+$  ( >50% ) suggérant un biais dans la fenêtre de sélection de ces cellules qui résisteraient mieux à la sélection négative (Jordan, Boesteanu et al. 2001; Apostolou, Sarukhan et al. 2002; van Santen, Benoist et al. 2004). Lorsque les cellules  $6.5^+CD25^+$  sont transférées dans des souris lymphopéniques HA<sup>-</sup> contrairement aux LyT  $6.5^+CD25^-$ , elles ne prolifèrent pas. En revanche, lorsque le transfert est effectué dans des souris HA<sup>+</sup>, les cellules  $6.5^+CD25^+$  prolifèrent activement au même titre que les LyT  $6.5^+CD25^-$ . Ces expériences suggèrent aussi que c'est majoritairement sur la base de la reconnaissance d'antigène spécifique du soi que les Treg sont maintenus en périphérie par prolifération homéostatique et pas nécessairement en fonction du niveau de cytokine comme l'IL-7 ou l'IL-15 comme pour les autres LyT naïfs ou mémoires.

### *c. Les Treg influencent l'homéostasie des $LyT\alpha\beta$*

Partant du fait que les Treg possédaient des propriétés de suppression aussi bien sur les LyT  $CD4^+$  que  $CD8^+$  *in vitro* et *in vivo*, il était naturel de penser que ces cellules pouvaient exercer un contrôle homéostatique sur les autres LyT. Le premier argument qui venait étayer cette hypothèse est le développement d'hyperplasies lymphocytaires dans les animaux  $IL-2^{-/-}$  ou  $IL-2R\alpha^{-/-}$  (Mackall, Bare et al. 1996; Malek 2003; Malek and Bayer 2004). La caractérisation de ces animaux a démontré l'absence de Treg autorisant une prolifération anarchique des clones de LyT autoréactifs entraînant l'apparition de pathologies auto-immunes. Enfin, pour démontrer définitivement que les Treg pouvaient exercer un contrôle sur le compartiment de LyT  $CD4^+$ , des expériences de transferts adoptifs de LyT  $CD4^+CD25^-$  cotransférés ou non avec des Treg ont été réalisées (Annacker, Pimenta-Araujo et al. 2001; Almeida, Legrand et al. 2002). Les résultats suggèrent que *in vivo*, les Treg limitent l'expansion des LyT  $CD4^+$ . Le mécanisme proposé semble dépendre d'une compétition pour l'IL-2 disponible. Les Treg auraient un avantage compétitif sur les autres LyT parce qu'ils expriment constitutivement l'IL-2R $\alpha$ . Des travaux similaires ont montré que les Treg contrôlaient aussi l'expansion des LyT mémoires  $CD8^+$  (Murakami, Sakamoto et al. 2002).

Cependant, les conclusions de l'ensemble de ces travaux sont à prendre avec précautions. En effet, les cellules sont manipulées avant transfert et mises en contact. On peut donc imaginer que les Treg ont exercé un effet de suppression sur les autres LyT avant le transfert, limitant ainsi leur capacité d'expansion. De plus, un tel mécanisme de suppression implique une colocalisation des sous-populations de LyT et de Treg. Ceci n'est pas encore montré, et certains travaux permettent d'envisager le contraire. En effet, les LyT CD4<sup>+</sup> et les Treg présentent des profils d'expressions différentiels de récepteurs aux chemokines (Iellem, Mariani et al. 2001) et des propriétés migratoires spécifiques (Iellem, Mariani et al. 2001; Agenes, Bosco et al. 2005).

Penser que les différentes sous-populations de LyT peuvent entrer en compétition ou interagir entre-elles pour contrôler l'homéostasie lymphocytaire est une hypothèse assez attractive. Cela fait intervenir un niveau de complexité supplémentaire qui rend les études un peu plus dures à commenter, d'autant plus que pour beaucoup, les sous-populations sont indépendantes et leurs contrôles homéostatiques sont régis par des « ressources » spécifiques (pour revue Freitas and Rocha 2000). Ceci ne semble plus être totalement vrai, l'IL-7 contrôle l'homéostasie des LyT et semble être importante pour toutes les sous-populations de LyT.

## **6. Peut-on encore parler d'homéostasie ???**

Il est clair que la composition et la taille du compartiment lymphocytaire présentent une certaine flexibilité. C'est une propriété qui complique significativement l'étude de l'homéostasie des LyT. Jusqu'à présent la majorité des études qui se sont penchées sur l'homéostasie des LyT ou LyB ont eu recours aux modèles de transferts adoptifs dans des receveurs lymphopéniques (après irradiation ou ablation génétique). Ce type d'expérience permet de suivre le comportement dynamique des lymphocytes transférés. Les LyT prolifèrent en conditions lymphopéniques. On a pu mettre à jour la contribution de nombreux paramètres impliqués dans la prolifération homéostatique. Cependant, les LyT transférés se différencient aussi, si bien qu'après deux semaines l'essentiel des cellules transférées adopte un phénotype mémoire (pour revue Ge, Hu et al. 2002). Pour parler de prolifération



homéostatique, il faut que les LyT prolifèrent, remplissent leur compartiment d'origine et conservent leurs propriétés phénotypiques et fonctionnelles. Or ceci n'est pas *sensu-stricto* le cas, et on préfère maintenant parler de prolifération induite par lymphopénie (PIL).

Initialement, d'après les travaux de Goldrath et Bevan, on pensait que cette modification de phénotype était transitoire (Goldrath, Bogatzki et al. 2000). Les LyT naïfs transférés adoptent temporairement un phénotype mémoire avec des propriétés fonctionnelles de LyT effecteurs (synthèse d'IFN $\gamma$  et propriétés cytotoxiques pour les LyT CD8<sup>+</sup>) puis ils retournent à leur phénotype naïf lorsqu'un niveau normal de LyT est atteint. Finalement, cette observation est fautive et la présence de lymphocytes naïfs dépend de l'export de RTE à la périphérie grâce à la reprise de la thymopoïèse. La reprise de la thymopoïèse a lieu parce que les suspensions de lymphocytes transférées contiennent toujours un petit nombre de progéniteurs T qui colonisent le thymus et génèrent de nouveaux lymphocytes naïfs. La colonisation du thymus est favorisée lorsque les receveurs sont irradiés (Tanchot, Le Campion et al. 2002).

La majorité des conclusions apportées par les travaux de transferts adoptifs pourraient donc être remise en cause ou s'avérer être irrelevante après comparaison avec les situations physiologiques où l'amplitude de variation du nombre de LyT est bien moins importante. Cependant de manière assez rassurante des études portant sur des souris néonatales où les organes lymphoïdes sont pratiquement vides en LyT ont montré qu'il y'a bien de la PIL (Min, McHugh et al. 2003; Schuler, Hammerling et al. 2004; Min, Yamane et al. 2005). Au cours de la prolifération, les LyT transférés ou les RTE subissent une modification de phénotype et ils adoptent un phénotype mémoire. Les rôles de l'IL-7 et de l'IL-15 ont même été confirmés dans ce système expérimental. Aussi, les systèmes d'études de la prolifération homéostatique à partir d'expériences de transferts adoptifs et qui analysent en fait de la PIL ne sont pas si artificiels que cela.

## 7. Conclusions et objectifs de l'étude

La population lymphocytaire T périphérique est donc une population en perpétuel renouvellement. C'est pourquoi les lymphocytes sont capables de proliférer en absence de stimulation antigénique, on parle de prolifération homéostatique. L'homéostasie lymphocytaire s'applique à l'ensemble des sous-populations de lymphocytes. Chacune de ces sous-populations répond à des processus actifs communs ou propres qui régulent les apports ou les pertes cellulaires. Les apports périphériques dépendent (i) du taux de lymphocytes nouvellement produits à partir des précurseurs thymiques, (ii) de leur capacité à migrer et coloniser le compartiment périphérique et (iii) de l'activité de prolifération et des propriétés de survie lymphocytaire au sein d'une population. L'ensemble des mécanismes qui régissent l'homéostasie lymphocytaire ne sont pas encore élucidés. La survie, la mort, la migration ou encore la prolifération constituent des déterminants importants de la dynamique lymphocytaire. Ils s'appliquent à chaque sous-population. Toutefois, il est important de noter que même si les mécanismes qui contrôlent chacun de ces déterminants commencent à être assez bien caractérisés, leurs importances respectives et leurs rôles globales pour régler l'homéostasie lymphocytaire ne sont pas encore caractérisés.

A partir de la caractérisation des animaux IL-7 Tg réalisés en 1993 (Fisher, Burdet et al. 1993), nous savions que l'IL-7 agissait de manière très précoce sur le développement des LyB, au niveau de la moelle osseuse et jusqu'au stade pré-B (Mertsching, Grawunder et al. 1996; Ceredig, Andersson et al. 1999). En revanche, aucun effet n'avait été observé sur les thymocytes (Mertsching, Burdet et al. 1995). Depuis, les connaissances concernant le développement thymique ont largement progressé et ont relancé la question du rôle de l'IL-7 dans la thymopoïèse. Ceci nous a conduit à étudier la thymopoïèse dans différents modèles de souris et notamment dans les souris IL-7 Tg. D'autre part, à mon arrivée au laboratoire, les effets de l'IL-7 et son mode d'action sur les LyB et LyT périphériques n'étaient pas claires et commençaient à susciter un intérêt assez important chez les immunologistes. C'est pourquoi, nous avons réalisé différents modèles de souris lymphopéniques sur-exprimant ou non l'IL-7. A partir de ces modèles expérimentaux nous avons disséqué les effets de l'augmentation de la concentration en IL-7 disponible dans un organisme sur l'homéostasie des LyB et des LyT. Ces travaux ont constitué l'essentiel de mon travail de thèse.

## **Chapitre 2 : Résultats**



## Préambule :

Les résultats des expériences conduites au cours de ma thèse sont présentés dans ce chapitre du manuscrit qui regroupe cinq articles.

◆ Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au développement précoce des lymphocytes T. Pour cela, nous avons mis au point une technique plus fine d'analyse des cellules DN au cours de la thymopoïèse. Nous avons utilisé différentes souches de souris présentant des défauts de différenciation ( $\text{Rag-2}^{-/-}$  ou  $\text{pT}\alpha^{-/-}$ ) et nous les avons comparées aux souris contrôles (C57BL/6). Cette analyse couplée à des marquages au BrdU, nous a permis de distinguer de façon plus précise les cellules DN et d'étudier leur comportement dynamique au cours de la différenciation. Par ailleurs, grâce à un panel assez large de marquages, nous avons caractérisé certains nouveaux aspects de la différenciation des LyT  $\gamma\delta$ . Ces résultats sont regroupés dans l'**article 1**. Certains résultats non publiés concernant la thymopoïèse chez les souris IL-7 Tg sont associés en complément à ces travaux.

◆ Dans un second temps, au cours de ma thèse nous avons développé deux modèles de souris déficientes en LyT et surexprimant l'IL-7. Ces deux modèles sont les souris  $\text{Rag-2}^{-/-}$ .IL-7 Tg et les souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$ .IL-7 Tg. Ces animaux, nous ont permis de réaliser des expériences de transferts adoptifs de LyT polyclonaux ou monoclonaux. Ainsi, nous avons pu étudier le comportement dynamique des LyT à court terme et à long terme dans un environnement enrichi en IL-7. Nos résultats ont permis de démontrer qu'il y'a bien une compétition entre les LyT pour une ressource limitée comme l'IL-7. En modifiant la quantité de cette ressource, nous observons une perturbation du contrôle homéostatique des LyT périphériques. Ces résultats sont regroupés dans l'**article 2**. En complément à ces travaux, nous avons étudié l'effet de la surexpression de l'IL-7 sur le compartiment de LyB périphériques dans les souris IL-7 Tg ou  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$ .IL-7 Tg. Les résultats obtenus sont regroupés dans l'**article 3**. Les aspects communs et les différences dans le contrôle homéostatique des LyB et LyT feront l'objet d'une discussion dans le chapitre suivant.

◆ Dans un troisième temps, j'ai eu la chance de pouvoir conduire certains travaux en parallèle concernant la biologie des LyT  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  ou lymphocytes T régulateurs (Treg).

La question de la diversité du répertoire TCR était soulevée dans la littérature. Grâce aux techniques développées dans le laboratoire, nous avons pu étudier la diversité du répertoire TCR $\alpha$  des LyT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> et des Treg (**article 4**). Ensuite, à partir d'expériences de parabiose de souris, nous avons déterminé certains aspects originaux de la migration *in vivo* des Treg (**article 5**). Enfin, nous nous sommes penchés sur l'homéostasie des Treg en conditions physiologiques ou lymphopéniques (**résultats complémentaires**). Les résultats les plus pertinents sont présentés à la fin de ce chapitre et feront l'objet d'un article qui est actuellement en préparation.

## Commentaires sur l'article 1

### **New insights into the proliferation and differentiation of early mouse thymocytes.**

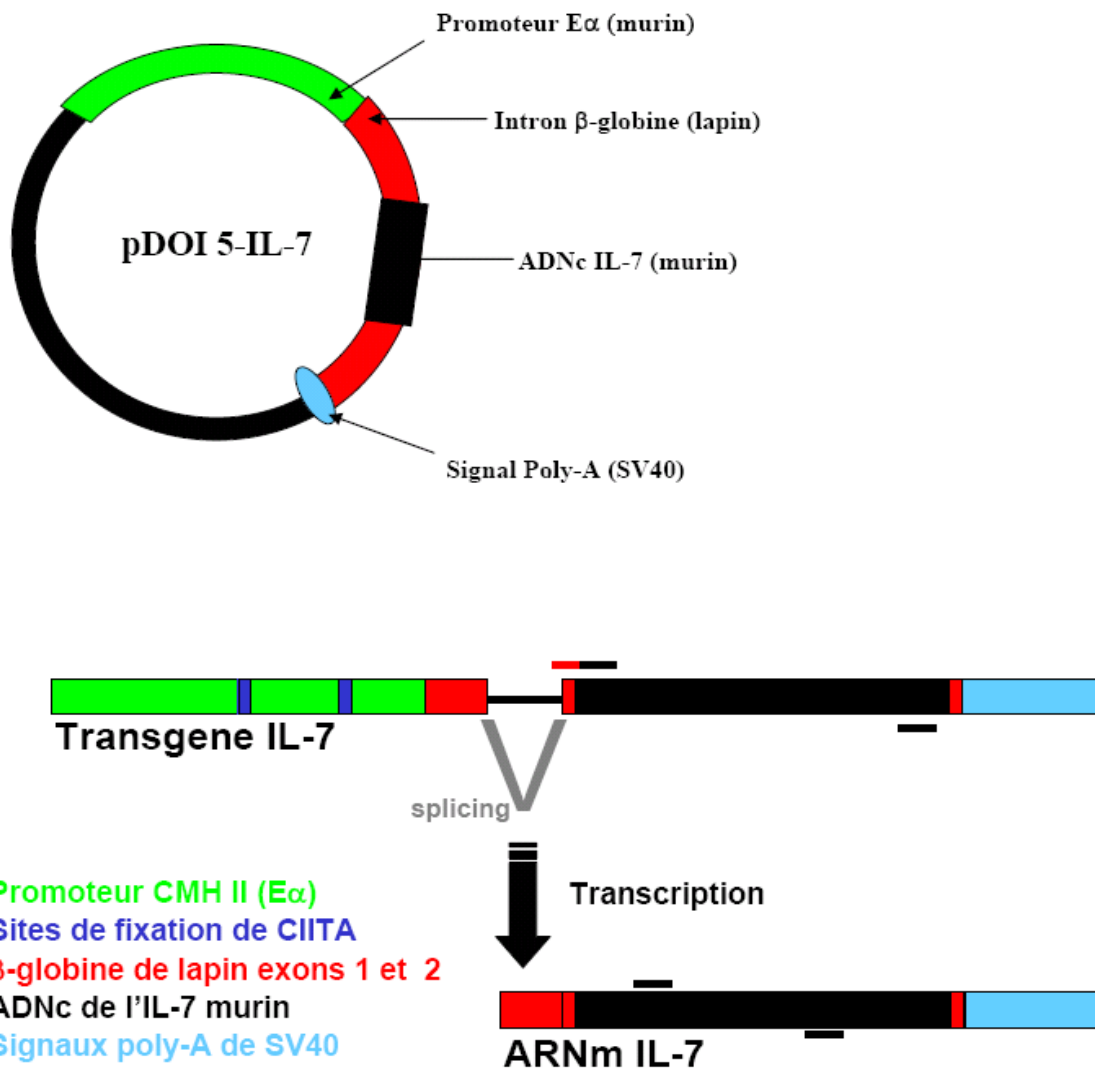
J. Laurent\*, N. Bosco\*, P.N. Marche, R. Ceredig.

\* J.L. and N.B. contributed equally to this work.

*International Immunology*, **2004**, 16(8), 1069-1080.

L'essentiel de ce travail a consisté à développer une nouvelle méthode d'analyse des cellules DN du thymus. Cette méthode nous a permis de mieux différencier les sous-populations de DN et d'établir un profil qualitatif et quantitatif plus détaillé que ceux décrits jusque-là. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence certains nouveaux aspects du développement thymique. Au cours de cette étude, nous avons utilisé différents modèles de souris sous le fond génétique C57BL/6 qui présentaient ou non des défauts de différenciation. Les souris Rag-2<sup>-/-</sup> présentent un blocage total de la différenciation thymique au stade DN3 (Shinkai, Rathbun et al. 1992). Les souris pTα<sup>-/-</sup> présentent un blocage partiel au stade DN3-DN4 et une réduction de la transition DN→DP. Ceci entraîne une expansion relative du compartiment DN et une réduction relative du compartiment DP (Fehling, Krotkova et al. 1995). Nous avons aussi utilisé un modèle de souris présentant un thymus anormalement développé : les souris VT4. Les souris VT4 expriment le transgène antigène T du virus SV40 sous le contrôle du promoteur du gène humain de la vimentine (Vicart, Schwartz et al. 1994). Enfin, ces expériences ont aussi été réalisées avec les souris IL-7 Tg (Fisher, Burdet et al. 1993). Ces animaux expriment un transgène de l'IL-7 murine sous le promoteur Eα du CMH II murin (Cf figure 2.1). Jusque-là, aucune anomalie n'a été identifiée dans l'architecture ou la différenciation thymique de ces souris (Mertsching, Burdet et al. 1995).

La différenciation thymique est un processus extrêmement régulé. En utilisant les marqueurs CD25 (chaîne α du récepteur de l'IL-2) et CD44 (récepteur du hyaluronate), les cellules DN sont subdivisées en 4 sous-populations (Cf Partie 2 du chapitre 1). Basé uniquement sur l'expression de ces deux marqueurs, le nombre de DN1 et DN4 est fréquemment surestimé. Les DN2 ne sont pas clairement identifiables et les études des propriétés phénotypiques et fonctionnelles des DN1 et DN2 peuvent être biaisées (pour revue Ceredig and Rolink 2002).



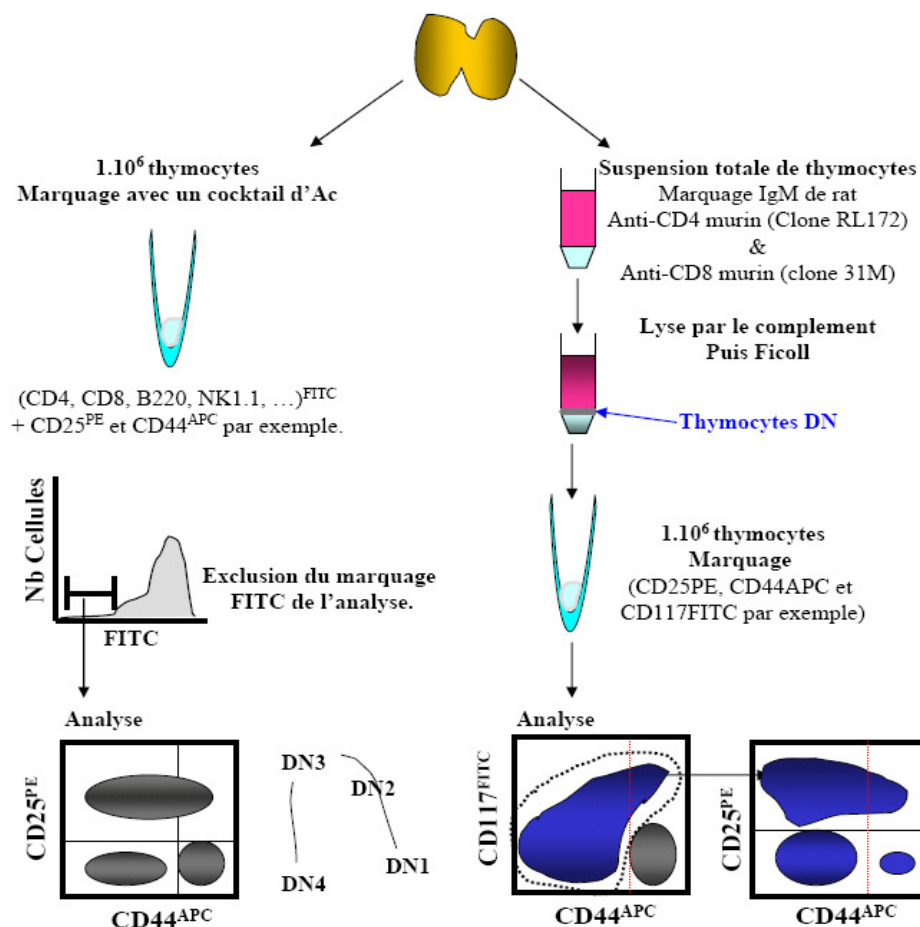
**Figure 2.1 :** Carte schématique du plasmide pDOI-IL-7 construit (en haut) et du transgène résultant (en bas) pour réaliser les souris IL-7Tg. Les primers qui permettent d'amplifier le transgène ou le transcrit IL-7 chez les souris sont représentés. D'après Fisher & al. 1993.



Ceci s'explique principalement par l'existence de cellules thymiques contaminantes n'appartenant pas à la lignée T mais exprimant à différents niveaux CD44. Souvent, on utilise un cocktail d'anticorps monoclonaux (anti-CD4, anti-CD8, anti-NK1.1, anti-B220...) couplés au même fluorochrome pour exclure les cellules contaminantes, les DP et SP lors de l'analyse de la distribution CD44 contre CD25 (Cf figure 2.2). Cependant, cette méthode présente toujours le défaut de ne pas pouvoir clairement définir les DN2 et peut même exclure certains progéniteurs T du compartiment DN1 issus de la moelle osseuse et rejoignant le thymus, comme les cellules CD4<sup>low</sup> (Wu, Scollay et al. 1991) ou B220<sup>+</sup> (Martin, Aifantis et al. 2003).

Notre méthode d'analyse est basée sur l'utilisation du marqueur c-kit (CD117) pour définir et distinguer le mieux possible les progéniteurs précoces DN1 et DN2. L'utilisation des marqueurs CD44 contre CD117, permet d'obtenir une forme particulière en « poire ». Les DN sont restreints à cette région. Après une lyse au complément, la déplétion des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> permet d'analyser plus finement les DN de cette région par cytométrie en flux 4-couleurs. La déplétion par lyse au complément permet de conserver les cellules DN CD4<sup>low</sup> (Ceredig and Rolink 2002). A partir des marquages CD44/CD25/CD117, les cellules DN1 et DN2 exprimant fortement CD117 sont clairement discriminées (Cf figure 2.2).

Notre analyse a permis de révéler que les DN1 sont aussi des cellules qui prolifèrent (marquage BrdU), que leur nombre est souvent surestimé dans les souris Rag-2<sup>-/-</sup>, notamment parce que ce compartiment CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> recèle beaucoup de cellules NK. En plus, nous avons observé deux voies de transition DN3-DN4 chez les souris WT et pTα<sup>-/-</sup>. Chez les souris WT, la majorité des cellules qui quittent le compartiment DN3 sont CD3<sup>-</sup> de type blaste et BrdU<sup>+</sup> (cellule en prolifération) cependant une petite partie d'entre-elles sont CD3<sup>+</sup> TCRγ<sup>+</sup> avec une petite taille et un marquage BrdU moins important. A l'inverse, chez les souris pTα<sup>-/-</sup>, les DN4 sont composés majoritairement de petites cellules CD3<sup>+</sup>TCRγ<sup>+</sup>. Ces résultats constituent des arguments en faveur de l'existence d'une voie de génération des LyT γδ au stade DN3-DN4.

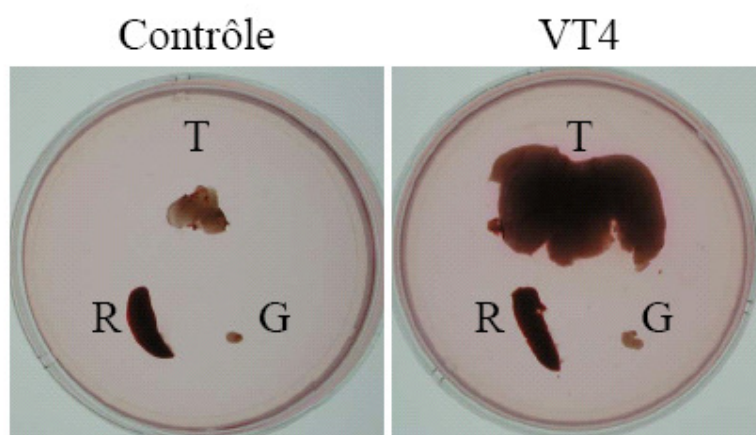


**Figure 2.2 : Méthodes d'analyses des thymocytes DN.**

La méthode classique d'analyse par cytométrie en flux est présentée à gauche. La méthode de préparation puis d'analyse des DN que nous avons utilisé est représentée à droite.

L'analyse des souris VT4 permet d'établir clairement que la taille des compartiments DN, DP et SP du thymus n'est pas statique. Nous avons observé une hyperplasie thymique affectant tout les compartiments de différenciation (cf figure 2.3). Les travaux de Nabarra B. et al. (Nabarra, Martinon et al. 2002), ont aussi montré que l'hyperplasie thymique observée affecte tous les types cellulaires de thymocytes mais aussi les cellules épithéliales. En vieillissant, leurs souris développent même des carcinomes (transformation des cellules épithéliales thymiques). Nous n'avons observé aucune hyperplasie au niveau des organes lymphoïdes périphériques, et le phénotype des LyT est normal (Cf figure 2.3 et résultats non publiés). Nabarra B. et al. (Nabarra, Martinon et al. 2002) ont montré qu'il y avait un défaut

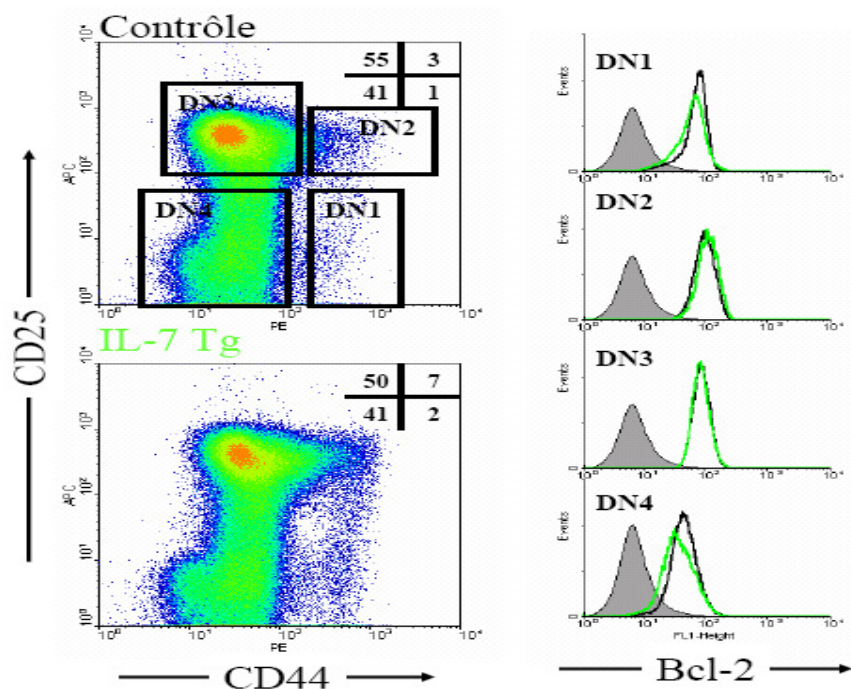
d'exportation thymique dans leur modèle de souris. Le promoteur qui contrôle l'expression de l'Ag T de SV40 est différent, il s'agit du promoteur de la L-pyruvate kinase. Cependant, on peut imaginer que le même phénomène explique pourquoi nous ne constatons pas d'anomalies de cellularité des LyT dans les souris VT4 adultes. Nous n'avons pas observé non plus d'apparition de carcinome thymique chez les souris adultes. Cependant, au delà de 6-8 semaines tous les animaux VT4 succombent pour des raisons non déterminées (résultats non publiés). Aussi, cette durée de vie très réduite pourrait ne pas laisser le temps nécessaire aux développements de pathologies cancéreuses dans notre modèle de souris VT4.



**Figure 2.3 :** Photographie des organes lymphoïdes principaux des souris contrôles à gauche ou VT4 transgéniques à droite. La rate (R), le ganglion lymphatique inguinal (G) et le thymus (T) sont photographiés.

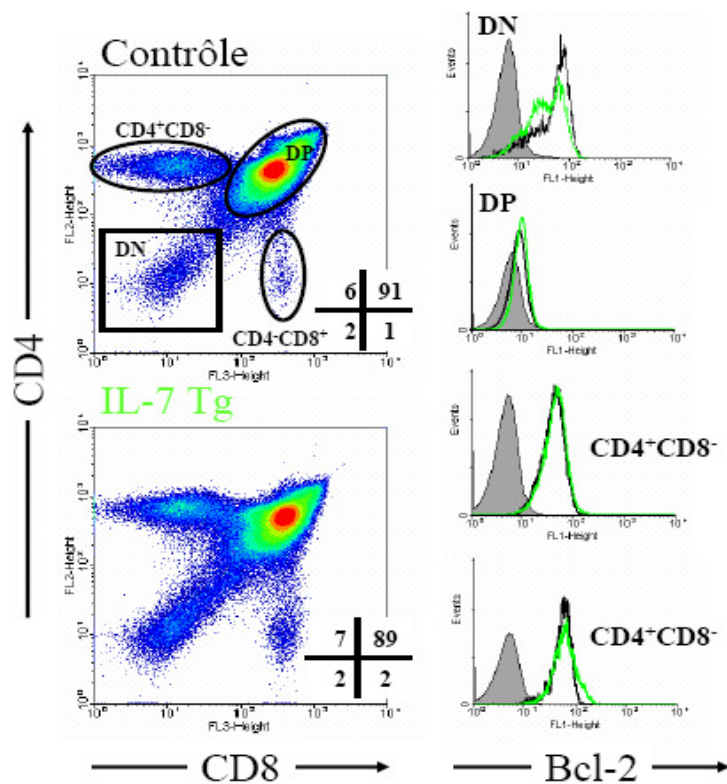
Les résultats obtenus avec les animaux IL-7 Tg, n'ont pas révélé un effet de l'IL-7 sur la différenciation thymique précoce ou tardive en comparaison avec les animaux WT. En effet, l'architecture thymique, la cellularité, le comportement cinétique de l'incorporation du BrdU dans les sous-populations de DN, DP et SP ne sont pas significativement différents entre les souris témoins et IL-7 Tg (résultats non publiés). Ceci est assez cohérent avec des résultats obtenus *in vitro* par Balciunaite G. et al. (Balciunaite, Ceredig et al. 2005) qui montrent qu'au delà du stade DN2, l'IL-7 n'exerce plus d'effet sur le développement de DN. De manière similaire, hormis une augmentation légère de la cellularité des compartiments DN1-DN2, aucun phénotype particulier n'a été observé dans les souris Rag-2<sup>-/-</sup>.IL-7 Tg, CD3ε<sup>-/-</sup>.IL-7 Tg, Rag-2<sup>-/-</sup>.TCRβ Tg.IL-7 Tg ou encore pTα<sup>-/-</sup>.IL-7 Tg ( Résultats non publiés et Bosco, Agenes et al. 2005).

Partant du constat que l'IL-7 agit sur la survie des précurseurs de LyT au niveau du thymus par une activation de l'expression de Bcl-2 (Maraskovsky, O'Reilly et al. 1997; O'Reilly, Harris et al. 1997), nous avons réalisé des marquages intracellulaires anti-Bcl-2 sur les différentes populations de thymocytes. Nous n'avons pas observé d'augmentation du niveau d'expression de Bcl-2 dans les différents compartiments de thymocytes en cours de différenciation (Cf figures 2.4 et 2.5). En revanche, les LyT périphériques expriment un niveau plus important de Bcl-2 dans les animaux IL-7 Tg, et plus particulièrement les LyT CD8<sup>+</sup> (Cf figure 2.6). L'enrichissement en LyT mémoires CD8<sup>+</sup> dans les animaux IL-7 Tg est probablement à l'origine de ce phénotype (Kieper, Tan et al. 2002).

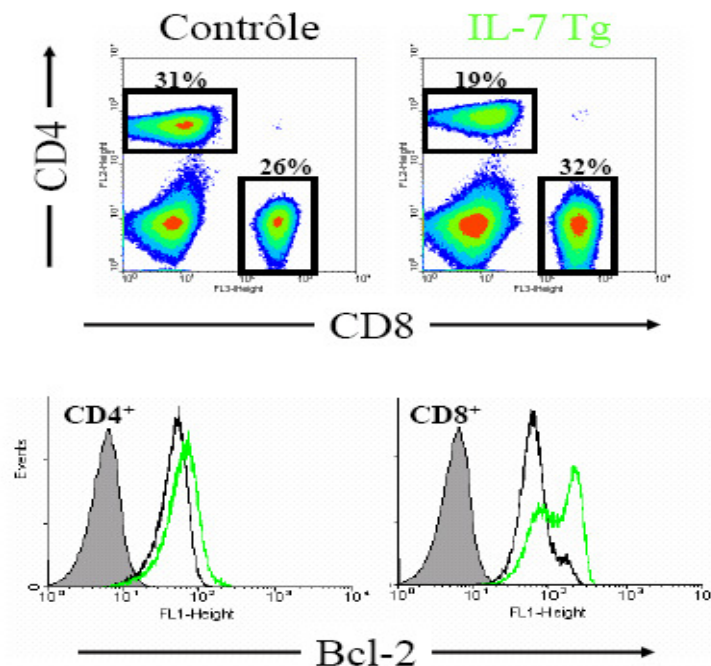


**Figure 2.4 :** Analyse du niveau d'expression intracellulaire de Bcl-2 dans les DN.

Les DN ont été purifiés d'après la méthode présentée dans la figure 2.2. Après marquage et fixation, le niveau d'expression de Bcl-2 dans les DN1 à 4 des souris contrôles et IL-7Tg a été étudié par cytométrie en flux. A gauche, les dot plots CD25 contre CD44 et les fenêtres utilisées pour discriminer les DN sont présentés. Les chiffres en haut à droite des dot plots correspondent aux % de chaque sous-population de DN. A droite, les histogrammes pour chaque sous-population de DN représentent le niveau d'expression de Bcl-2 pour les souris contrôles (en noir) ou IL-7Tg (en vert). Les histogrammes gris indiquent le niveau de bruit de fond obtenu avec un anticorps isotype contrôle.



**Figure 2.5:** Analyse du niveau d'expression intracellulaire de Bcl-2 dans les thymocytes totaux. Après marquage et fixation, le niveau d'expression de Bcl-2 dans les DN, DP et SP des souris contrôles et IL-7Tg a été étudié par cytométrie en flux. A gauche, les dot plots CD4 contre CD8 et les fenêtres utilisées pour discriminer les sous-populations de thymocytes sont présentés. Les chiffres en bas à droite des dot plots correspondent aux % de chaque sous-population de thymocyte. A droite, les histogrammes pour chaque sous-population représentent le niveau d'expression de Bcl-2 pour les souris contrôles (en noir) ou IL-7Tg (en vert). Les histogrammes gris indiquent le niveau de bruit de fond obtenu avec un anticorps isotype contrôle.



**Figure 2.6:** Analyse du niveau d'expression intracellulaire de Bcl-2 dans les splénocytes. Après marquage et fixation, le niveau d'expression de Bcl-2 dans les LyT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> des souris contrôles et IL-7Tg a été étudié par cytométrie en flux. En haut, les dot plots CD4 contre CD8 et les fenêtres utilisées pour discriminer les LyT sont présentés. Les chiffres dans les dot plots correspondent aux % de chaque sous-population de LyT. En bas, les histogrammes pour chaque sous-population de LyT représentent le niveau d'expression de Bcl-2 pour les souris contrôles (en noir) ou IL-7Tg (en vert). Les histogrammes gris indiquent le niveau de bruit de fond obtenu avec un anticorps isotype contrôle.

Des résultats récents obtenus avec d'autres souches de souris IL-7 Tg (expression sous le contrôle du promoteur du gène *lck*, *lck*-IL-7 Tg) démontrent que l'IL-7, à travers un effet dose-dépendant, influence la thymopoïèse surtout au stade DN et dans le passage DN→DP (El Kassar, Lucas et al. 2004). Différentes hypothèses peuvent être émises pour expliquer la différence entre nos résultats et ceux de El Kassar N. et al. D'abord, on peut imaginer que le niveau de production thymique de l'IL-7 dans nos souris soit beaucoup moins important et ne peut stimuler la thymopoïèse. Mais ceci est peu probable d'après des expériences de RT-PCR quantitative qui montrent que la production des transcrits de l'IL-7 dans les animaux transgéniques est ~1000 fois supérieure à celle des animaux contrôles contre ~230 fois dans les souris *lck*-IL-7 Tg (résultats non publiés). Par contre, on peut imaginer que la localisation des cellules qui produisent l'IL-7 est importante et qu'elle diffère entre ces deux modèles de souris IL-7 Tg. Les travaux de El Kassar N. et al., soulignent que l'IL-7 exerce un effet paracrine. Dans ce modèle de souris *lck*-IL-7 Tg, ce sont les thymocytes eux-mêmes (*lck*<sup>+</sup>) qui produisent et consomment l'IL-7. Dans notre modèle de souris IL-7 Tg, l'IL-7 est synthétisée par les cellules CMH II<sup>+</sup>, celles-ci sont principalement des cellules hématopoïétiques localisées dans la médulla du thymus. Au niveau de la médulla, on retrouve majoritairement les cellules SP. Dans notre modèle de souris, l'absence de phénotype caractéristique au niveau de la thymopoïèse précoce (stade DN, localisation corticale) devient plus logique. Cependant, il subsiste certaines questions concernant le rôle de l'IL-7 dans la différenciation en LyT γδ ou encore le choix du lignage CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Nous n'avons malheureusement pas abordé ces questions au cours de la période de ma thèse.

## Commentaires sur l'article 2

### **Effects of increasing IL-7 availability on lymphocytes during and after lymphopenia-induced proliferation.**

N. Bosco, F. Agenès, R. Ceredig.

*The Journal of Immunology*, **2005**, 175(1), 162-170.

Après les étapes de sélection et de maturation au niveau du thymus, les LyT matures fraîchement générés rejoignent la périphérie. Le compartiment périphérique de LyT est soumis à une régulation homéostatique (Cf Chapitre 1, Partie 4). Les différentes sous-populations de lymphocytes naïfs et mémoires sont soumises à des règles communes ou plus spécifiques pour se maintenir en périphérie. Néanmoins, les signaux médiés par l'IL-7 sont d'une importance capitale pour maintenir les LyT en périphérie et plus particulièrement les LyT naïfs (Cf chapitre 1).

L'IL-7 agit sur la prolifération et la survie périphérique des LyT. Le modèle le plus probable pour expliquer le rôle de l'IL-7 dans les mécanismes d'homéostasie lymphocytaire était que son niveau de concentration contrôle la prolifération et la survie périphérique des LyT. Dans une situation normale, la concentration de l'IL-7 est faible mais stable. Un équilibre s'établit entre la production de la cytokine et sa consommation par les LyT résidents dans les organes lymphoïdes. Par contre, dans une situation de lymphopénie, ce modèle voudrait que le niveau de l'IL-7 soit plus élevé étant donné que les LyT sont absents ou moins nombreux pour consommer l'IL-7 produite (Fry and Mackall 2001). Cette différence de concentration serait perçue comme un signal stimulant la prolifération homéostatique (ou la PIL). Les contacts TCR/CMH-pAg constituent un premier signal et le niveau de concentration de l'IL-7 agirait comme un second signal en synergie avec le premier pour influencer la capacité de prolifération des LyT stimulés. Ce scénario était assez séduisant et expliquait la majorité des résultats obtenus après transfert adoptif dans des situations de lymphopénie ou encore l'expansion considérable des LyT dans les animaux IL-7 Tg et notamment les LyT mémoires (Schluns, Kieper et al. 2000; Tan, Dudl et al. 2001; Kieper, Tan et al. 2002). Cependant, il n'y avait pas de preuves expérimentales claires pour appuyer ce modèle.

Nous avons donc entrepris de tester cette hypothèse. Pour cela nous avons généré des animaux lymphopéniques surexprimant l'IL-7 par croisements successifs. Deux modèles ont été réalisés, les souris Rag-2<sup>-/-</sup>.IL-7 Tg et les souris CD3ε<sup>-/-</sup>.IL-7 Tg. Les animaux CD3ε<sup>-/-</sup>.IL-7 Tg présentaient l'avantage de conserver une activité de lymphopoïèse B absente dans les animaux Rag-2<sup>-/-</sup>.IL-7 Tg. La présence de cellule B (CMH II<sup>+</sup> chez la souris) entraîne une synthèse d'IL-7 plus importante dans ces animaux comparés aux souris Rag-2<sup>-/-</sup>.IL-7 Tg. Auparavant, nous avons rapporté les effets caractéristiques de l'excès d'IL-7 sur les LyB immatures et matures. Ainsi, en étudiant les compartiments de LyB, nous pouvions aussi affirmer que l'IL-7 produite en excès était fonctionnelle.

Les animaux CD3ε<sup>-/-</sup>.IL-7 Tg<sup>+</sup> et CD3ε<sup>-/-</sup>.IL-7 Tg<sup>-</sup> (CD3ε<sup>-/-</sup>) ont servi de receveurs dans des expériences de transferts adoptifs. Ces expériences nous ont permis de caractériser les effets de l'IL-7 à court terme et à plus long terme après le transfert de LyT polyclonaux naïfs ou totaux, mais aussi de LyT TCR Tg (résultats non publiés). Nous avons effectivement démontré que le niveau d'IL-7 contrôlait l'activité de prolifération mais aussi la survie des LyT. Les effets de l'IL-7 sont toutefois différents entre les LyT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en condition de lymphopénie (à court terme après le transfert adoptif) ou lorsque le compartiment de LyT a atteint son niveau d'équilibre (>14jours après transfert adoptif). L'IL-7 exerce un effet stimulant les capacités de survie des LyT CD4<sup>+</sup> assez rapidement alors que son rôle dans l'activité de prolifération est plus modeste. En revanche, pour les LyT CD8<sup>+</sup> l'IL-7 exerce un effet plus important dans la stimulation des capacités de prolifération. L'IL-7 stimule aussi les capacités de survie des LyT CD8<sup>+</sup> mais plus tardivement et de manière plus importante que pour les LyT CD4<sup>+</sup>.



## Commentaires sur l'article 3

### **In interleukin-7-transgenic mice, increasing B lymphopoiesis increases follicular but not marginal zone B cell numbers.**

R. Ceredig, N. Bosco, P.N. Marche, J. Anderson, A. Rolink.

*The European Journal of Immunology*, 2003, 33(9), 2567-2576.

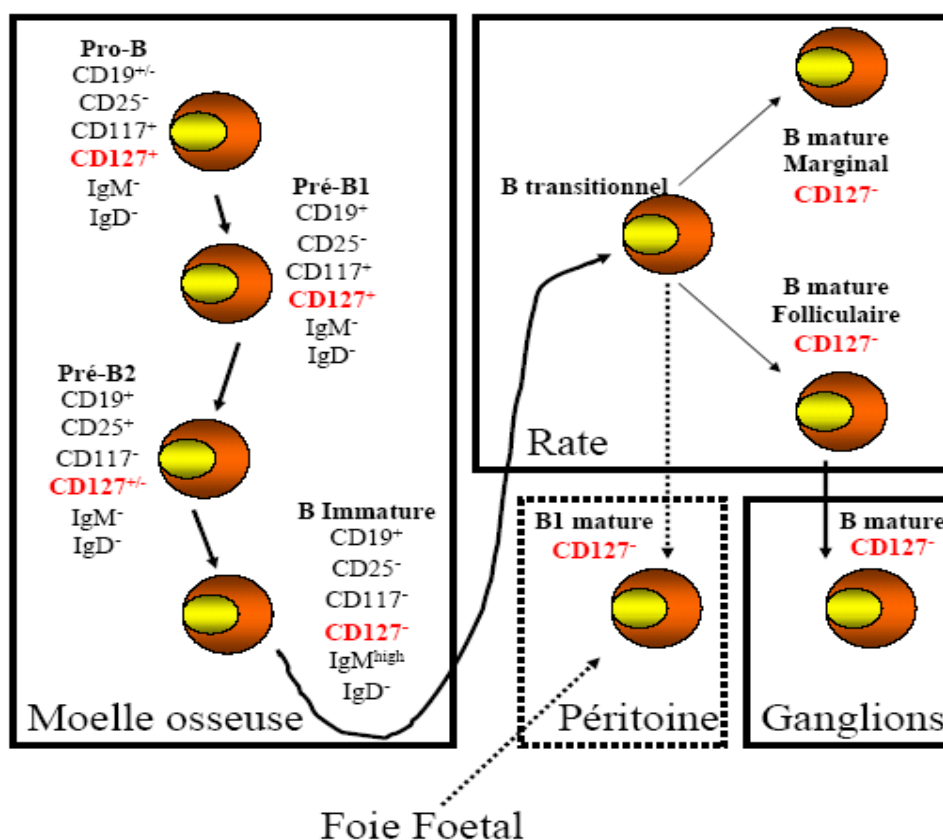
La moelle osseuse contient les précurseurs des LyB qui se différencient jusqu'au stade de LyB immatures. Par analogie avec les LyT, les étapes de différenciation des LyB dépendent des réarrangements de segments de gènes codant pour le récepteur à l'antigène ainsi que d'interactions avec les antigènes du soi mais aussi les cellules stromales de la moelle osseuse. Au niveau de la moelle, les précurseurs de LyB progressent du stade pro-B au stade pré-B puis enfin génèrent des cellules B immatures exprimant un BCR fonctionnel (pour revue Rolink, ten Boekel et al. 1999). Les cellules B immatures subissent une étape de sélection négative qui élimine les cellules autoréactives. Les cellules survivant à cette étape de sélection peuvent alors migrer vers les organes lymphoïdes périphériques notamment la rate et achever leur différenciation en cellules B matures (Cf figure 2.7). Les LyB immatures qui rejoignent la rate composent le compartiment des cellules B transitionnelles. On distingue 2 voire 3 populations de cellules B transitionnelles (T1, T2 et T3) en fonction des marqueurs utilisés (Cf tableau 2.1 et Loder, Mutschler et al. 1999; Allman, Lindsley et al. 2001).

populations de lymphocytes B matures de la rate					
References	T1	T2	T3	B folliculaire	B Marginal
Allman & al.	CD21- CD23- 493+ IgM++	CD21+/- CD23++ 493+ IgM++	CD21+/- CD23++ 493+ IgM+	CD21+/- CD23++ CD24+/- 493- IgM+/- IgD++	CD21++ CD23+/- CD24++ 493-
Loder & al.	CD21- CD23- CD24++ IgM++ IgD+/-	CD21++ CD23++ CD24++ IgM++ IgD++			IgM++ IgD+/-
Localisation	PALS	Follicule			Zone marginale

PALS: zone périartériolaire

**Tableau 2.1** : Phénotype et localisation des populations de LyB transitionnels (T1 à T3), folliculaires ou marginaux retrouvées dans la rate.

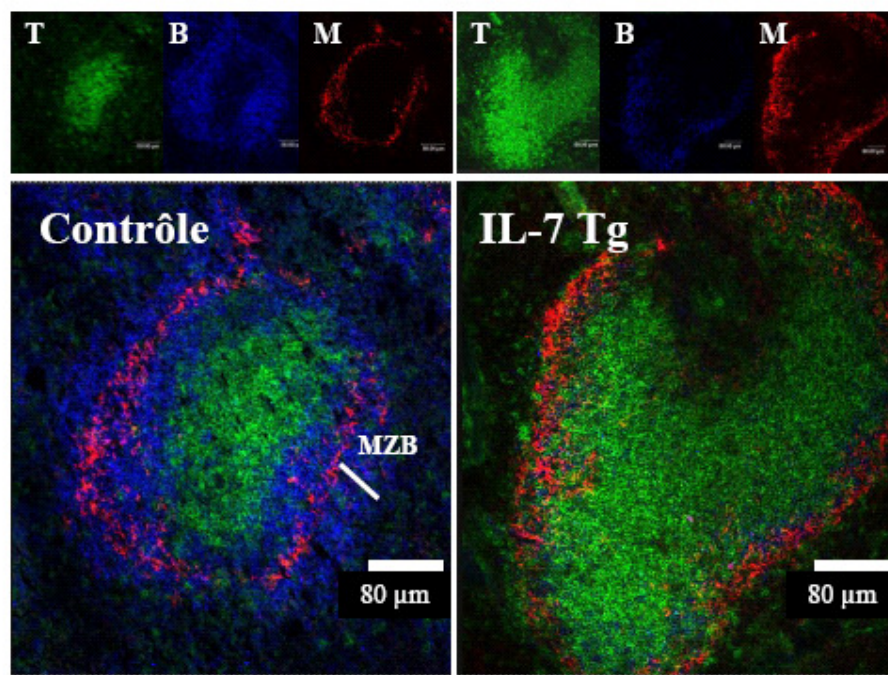
Les cellules T2 ou T3 sont les plus matures et sont localisées dans les follicules lymphoïdes où elles subiront une étape de différenciation terminale pour générer des LyB matures logés dans le follicule (dits de type folliculaire ou FB) B220<sup>+</sup> IgM<sup>low</sup> IgD<sup>high</sup> CD21<sup>+</sup> CD23<sup>+</sup> ou regroupés dans la zone marginale du follicule (dits de type marginal ou MZB) B220<sup>+</sup> IgM<sup>high</sup> IgD<sup>low</sup> CD21<sup>+</sup> CD23<sup>low</sup>. Les FB représentent ~90% des LyB matures tandis que les MZB ne représentent que moins de 10% des LyB matures. Les facteurs qui gouvernent la différenciation en FB ou MZB à partir de cellules B transitionnelles ne sont pas complètement élucidés. De plus, aucun précurseur spécifique de chacune de ces populations n'a pu être identifié. Néanmoins, il semble que l'intensité des signaux via le BCR, ou encore les voies de signalisation médiées par Notch, ou même l'IL-7 participent à ce choix de lignage (pour revue Martin and Kearney 2002).



**Figure 2.7 :** Schéma de différenciation des LyB.

Ce schéma comprend le phénotype et la localisation associés aux étapes principales de la lymphopoïèse B. Chez l'adulte la lymphopoïèse B commence dans la moelle osseuse et s'achève principalement dans la rate pour créer des cellules B2 de type folliculaire (FB) ou marginal (MZB). Les FB émigrent vers les ganglions lymphatiques. Les cellules B1 retrouvées dans le péritoine sont initialement dérivées de précurseurs du foie fœtal puis de la rate. L'expression de l'IL-7R $\alpha$  (CD127) au cours de la lymphopoïèse B est indiquée en rouge.

Il existe deux familles de LyB matures : les B-1 et les B-2. Les FB et MZB appartiennent à la famille dite conventionnelle des B-2. Les B-1 sont des LyB beaucoup moins nombreux et que l'on retrouve dans la cavité péritonéale. Ils sont composés des cellules B-1a majoritaires et  $CD5^+$  et des cellules moins nombreuses les B-1b qui sont  $CD5^-$ . Les B-1 partagent certaines propriétés fonctionnelles avec les cellules B-2 de type MZB. Ils secrètent des IgM polyréactives, capables de reconnaître un grand nombre d'Ag et éliminer les pathogènes reconnus de manière très rapide sans faire intervenir une réponse immunitaire adaptative avec la participation des LyT : on parle de réponse immunitaire T-indépendante. Cependant, les MZB présentent la particularité d'être localisées à la périphérie des follicules lymphoïdes, derrière une ceinture de macrophages marginaux  $MOMA^+$  (Cf figure 2.8).



**Figure 2.8** : Analyse par microscopie confocale des follicules lymphoïdes de la rate chez les souris contrôles (à gauche) ou IL-7Tg (à droite). Les cryosections de rate (5-7 $\mu$ m) sont fixées puis marquées avec un anti-Thy1<sup>FITC</sup>, un anti-B220<sup>Cy5</sup> et un anti-MOMA<sup>PE</sup>. Les follicules lymphoïdes sont situés dans la pulpe blanche de la rate, autour il y'a la pulpe rouge. La zone T apparaît en vert (LyT Thy1<sup>+</sup>), la zone B (LyB B220<sup>+</sup>) apparaît en bleu. Au sein de la zone B, les macrophages de la zone marginale (MOMA<sup>+</sup>) apparaissent en rouge, au-delà de cette ceinture de macrophages, les LyB en bleu sont principalement des MZB. Dans les souris IL-7Tg, la zone B est très réduite au profit de la zone T très largement répandue. On distingue à peine certains MZB.

Les cellules FB sont regroupées dans les follicules à proximité des LyT. Cette localisation favorise la communication LyT–LyB et permet de monter une réponse immune T-dépendante. Celle-ci nécessite la différenciation des LyB activés en LyB mémoires dans les centres germinatifs créés au sein des follicules. Lors d’une réponse immune T-dépendante, les cellules FB activées produiront majoritairement des IgG de fortes affinités mais dans un délai plus long (2 semaines) que pour la réponse immune T-indépendante (quelques heures) (pour revue Martin and Kearney 2002).

L’analyse des animaux IL-7<sup>-/-</sup> (Carvalho, Mota-Santos et al. 2001), montre qu’une activité résiduelle de lymphopoïèse B persiste (~10% de la normale). Dans ces animaux, la majorité des LyB générés sont de type MZB. Les auteurs de ces travaux ont alors suggéré que l’IL-7 favorisait le développement et/ou le lignage en FB. D’autre part, les précurseurs des MZB n’étant pas identifiés, certains travaux suggèrent que les FB peuvent générer des MZB (pour revue Martin and Kearney 2002). Les précurseurs de LyB expriment l’IL-7R $\alpha$  jusqu’au stade pré-B, alors que les LyB matures sont IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> (Cf figure 2.7). L’analyse des animaux mutants pour la voie de signalisation IL-7 dépendante a permis de révéler les rôles de cette cytokine dans la différenciation médullaire des LyB immatures. Les signaux délivrés par l’IL-7 assurent la survie, la prolifération mais aussi le réarrangement de la chaîne lourde des Ig (Allman and Miller 2003; Allman, Srivastava et al. 2004). Néanmoins, personne ne s’était penché sur les effets de la surexpression de l’IL-7 sur le compartiment des LyB matures.

Lors de notre étude sur le compartiment des LyB matures dans les animaux IL-7 Tg, nous avons observé un défaut relatif du compartiment MZB. La proportion de MZB dans les animaux IL-7 Tg était environ 20-30 fois inférieure à celle des animaux contrôles. Néanmoins, le nombre de cellules MZB était comparable. A travers des analyses phénotypiques et fonctionnelles, nous avons confirmé la nature, la localisation (Cf figure 2.8) et les propriétés de ces cellules. Elles sont comparables entre les animaux contrôles et IL-7 Tg. L’IL-7 influence cependant l’homéostasie des différentes populations de LyB matures. Nous avons cherché à expliquer ce phénomène. Des expériences de chimères de moelles osseuses et de cinétique d’incorporation de BrdU ont permis de compléter nos observations et montrer que l’IL-7 influençait la production des FB mais pas celle de MZB. L’ensemble de ces résultats constitue un argument en faveur de l’indépendance des compartiments MZB et FB. Il suggère aussi que le phénotype obtenu dans les animaux IL-7<sup>-/-</sup> (Carvalho, Mota-Santos

et al. 2001) est une conséquence indirecte de l'absence de lymphopoïèse B, ne générant pas suffisamment de LyB, le petit nombre mais aussi l'essentiel des LyB obtenus sont des MZB dont le développement est IL-7 indépendant.

L'augmentation du compartiment de cellules FB n'a pas eu d'effets sur le compartiment de cellules MZB. Cependant, il est important de noter que l'éventualité que les cellules FB puissent générer des cellules MZB, n'est pas totalement à exclure. Elle dépend certainement des modèles expérimentaux utilisés. Par exemple, après transferts adoptifs de cellules FB dans des receveurs lymphopéniques, la majorité des cellules persistantes adopte le phénotype MZB (résultats non publiés et Balciunaite, Ceredig et al. 2005). Par ailleurs, dans des chimères de moelles osseuses où on limite la production de LyB, la majorité des LyB produits adopte le phénotype des MZB (résultats soumis et Agenes and Freitas 1999; Agenes 2003). Contrairement aux LyT, lorsqu'on transfère un petit nombre de LyB ( $1-10 \cdot 10^6$ ) dans les souris Rag-2<sup>-/-</sup> ou Rag-2<sup>-/-</sup>.IL-7 Tg, ils prolifèrent de manière comparable dans les deux types de receveurs et se différencient en cellules MZB (phénotype et fonction similaires) mais leur expansion est limitée. Si bien que l'état de lymphopénie B persiste (résultats non publiés). La génération prioritaire de LyB de type MZB en conditions lymphopéniques pourrait constituer une barrière de défense de type innée, optimale pour l'organisme même dans des conditions extrêmes. C'est une hypothèse assez finaliste qui est proposée mais qui mérite d'être étudiée. Nous reviendrons sur cette idée dans le chapitre suivant.



## Commentaires sur l'article 4

### **Role of the T cell receptor alpha chain in the development and phenotype of naturally arising CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells.**

N. Bosco, H.C. Hung, N. Pasqual, E. Jouvin-Marche, P.N. Marche, N.R.J. Gascoigne, R. Ceredig.

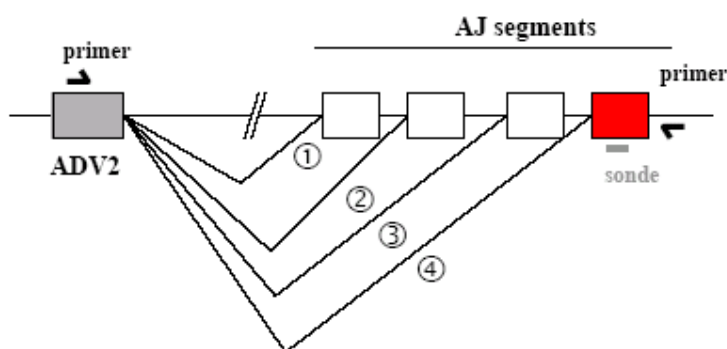
*Molecular Immunology*, **2006**, in press.

Certains LyT CD4<sup>+</sup> générés au niveau du thymus expriment naturellement la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25), contrairement aux autres LyT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ou CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> qui expriment le marqueur CD25 seulement après activation (pour revue Shevach 2002). Les LyT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ou lymphocytes T-régulateurs (Treg) sont anergiques et suppressifs (pour revue Shevach 2002; Sakaguchi 2004). Ils sont exportés à la périphérie et leur propriété de suppression est importante pour limiter l'expansion de LyT autotractifs et donc l'apparition de pathologies auto-immunes. De nombreux travaux permettent de penser que le développement et la fonction des Treg sont dépendants de la spécificité de leur TCR. Par exemple, les Treg ne se développent pas dans des souris CD4<sup>+</sup> TCR Tg dans un fond Rag<sup>-/-</sup> (Jordan, Boesteanu et al. 2001; Apostolou, Sarukhan et al. 2002; Hori, Carvalho et al. 2002; Hori, Haury et al. 2002). On peut donc imaginer que seuls certains thymocytes CD4<sup>+</sup> en cours de développement et exprimant un TCR d'une certaine spécificité peuvent générer des Treg. On peut aussi émettre l'hypothèse que les réarrangements endogènes et notamment les réarrangements TCR $\alpha$  (pour qui l'exclusion allélique n'est pas stricte) soient importants pour le développement des Treg (Hori, Haury et al. 2002). D'autre part, il semblerait que *in vitro* et *in vivo* les propriétés de suppression des Treg nécessitent un contact via leur TCR (pour revue Shevach 2002). Il y'a donc plusieurs données qui soulignent l'importance du TCR pour le développement et la fonction des Treg. Cependant, il y avait peu de données concernant le répertoire TCR $\alpha\beta$  de ces cellules.

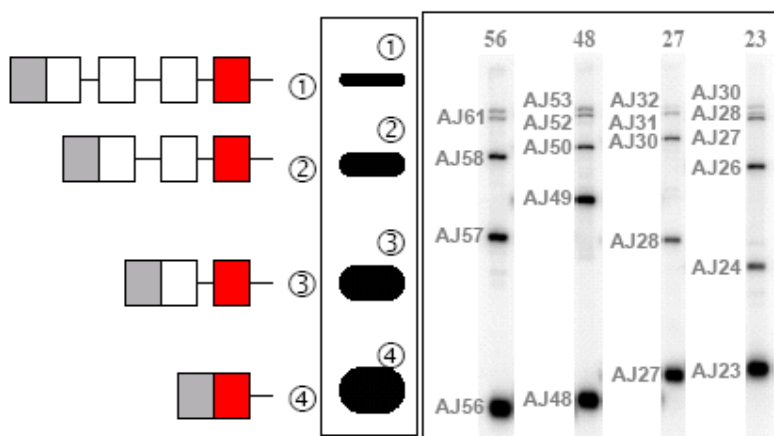
Nous avons donc entrepris en 2002 une analyse plus fine du répertoire des Treg, principalement à partir d'une technique de PCR multiplexe développée au laboratoire (Cf figure 2.9) (Mancini, Candeias et al. 2001; Pasqual, Gallagher et al. 2002). Ainsi, nous avons pu établir un profil assez large des réarrangements ADV-AJ des chaînes TCR $\alpha$  exprimées par

les Treg et les autres LyT CD4<sup>+</sup>. En combinant ces résultats à une analyse de cytométrie en flux du répertoire TCRβ, nous avons pu établir que le répertoire des Treg était aussi large que celui des autres LyT CD4<sup>+</sup> dans une souris sauvage. De plus, l'analyse des souris TCRα<sup>+/-</sup>, nous a permis de démontrer que le développement des Treg était indépendant de l'expression de deux chaînes TCRα. Ces résultats s'avéreront être similaires et/ou complémentaires avec ceux du groupe de Rudensky A.Y. menés sur des souris TCRβ Tg (Hsieh, Liang et al. 2004) ou avec ceux du groupe de Riberdy J.M. menés sur des LyT humains (Kasow, Chen et al. 2004).

### A. Couple de primers et sonde



### B. Produits de réarrangements détectables et visualisation Après Southern Blot.



**Figure 2.9 :** Principe et méthodologie de la PCR multiplexe pour étudier les réarrangements ADV-AJ de la chaîne α du TCR. Des primers et des sondes spécifiques (A) ont été dessinés pour amplifier et visualiser spécifiquement les produits de réarrangements possibles (B) entre un segment ADV et un segment AJ. Les produits de réarrangements sont identifiés en fonction de leur taille après southern blot. En (B) à droite les 4 pistes du Southern blot représentent les résultats caractéristiques obtenus avec l'amplification des couples de primers ADV2-AJ56, ADV2-AJ48, ADV2-AJ27 ou ADV2-AJ23.



## Commentaires sur l'article 5

### **Differential expression of regulator of G-protein signalling transcripts and *in vivo* migration of CD4<sup>+</sup> naive and regulatory T cells.**

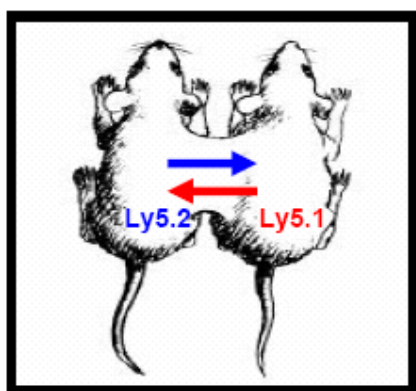
F. Agenès, N. Bosco, L. Mascarell, S. Fritah, R. Ceredig.

*Immunology*, **2005**, 115(2), 175-188.

La biologie des Treg constitue l'un des domaines des plus attractifs en immunologie depuis les cinq dernières années. Malgré le nombre impressionnant de publications concernant cette population particulière de LyT, de nombreuses questions basiques restent en suspens (pour revue Shevach 2002). Après avoir abordé la question du répertoire TCR de ces cellules, nous nous sommes intéressés à leurs propriétés migratoires *in vivo*.

Les Treg ont été détectés dans différents organes lymphoïdes comme le thymus, les ganglions lymphatiques, la rate, le sang ou encore le placenta pendant la grossesse (pour revue Shevach 2002; Sakaguchi 2004). Leur propriété suppressive nécessite un contact cellule-cellule avec les autres LyT (Thornton and Shevach 2000). Il est donc possible que leur fonction soit principalement assurée au sein des organes lymphoïdes. D'un autre côté, chez l'homme, les Treg ont été détectés dans de nombreux tissus périphériques ou sites inflammatoires comme le liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Cao, Malmstrom et al. 2003), les tumeurs solides du poumon (Woo, Yeh et al. 2002) ou des ovaires (Curiel, Coukos et al. 2004). Chez la souris, les Treg ont été détectés dans les lésions de la peau qui suivent une infection au *Leishmania* (Belkaid, Piccirillo et al. 2002) ou encore les intestins au cours de la colite (Mottet, Uhlig et al. 2003). De plus, certaines études ont montré que le transfert adoptif de Treg pouvait limiter ou gêner une réponse immune spécifique (Suri-Payer, Amar et al. 1998; Mottet, Uhlig et al. 2003; Tang, Henriksen et al. 2004; Tarbell, Yamazaki et al. 2004). A partir de ces données, nous avons imaginé que des propriétés de localisation ou de migration différentielles entre les LyT conventionnels et les Treg pouvaient expliquer pourquoi ces deux types cellulaires cohabitent sans pour autant « se marcher sur les pieds » lors d'une réponse immune par exemple.

Nous avons testé les propriétés migratoires des LyT CD4<sup>+</sup> naïfs et des Treg. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de transwell puis des parabioses de souris (Cf figure 2.10). Les résultats obtenus *in vitro* montrent que les Treg répondent différemment aux chemokines quand on les compare aux LyT CD4<sup>+</sup> naïfs. *In vivo*, nous avons constaté que les propriétés migratoires des Treg sont fortement limitées. Ces cellules sont très statiques. En revanche, les LyT naïfs ont la capacité de migrer en dehors des organes lymphoïdes en circulant par le sang. Ceci s'est traduit par un chimérisme beaucoup plus important des LyT CD4<sup>+</sup> naïfs entre les deux parabionts dans la rate et les ganglions (~50% dès 14 jours) alors qu'il est beaucoup plus faible pour les Treg (~5-10%). Il était difficile de réaliser ces expériences sur d'autres organes périphériques. Parce que, d'une part peu de Treg migrent, et d'autre part les Treg des tissus périphériques ne sont pas encore très bien caractérisés.



**Figure 2.10 :** Représentation schématique d'une parabiose de souris. Les parabionts sont joints par les flancs. On peut discriminer facilement les cellules issues de l'un ou l'autre des parabionts lorsque ceux-ci portent un marqueur allotypique distinct de type Ly5.1 et Ly5.2 par exemple.

En complément à ces résultats, nous avons pu corréler l'activité de migration des LyT au niveau d'expression de molécules régulatrices négatives (RGS) des signaux médiés par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les récepteurs aux chémokines sont des RCPG qui contrôlent les propriétés migratoires des LyB et des LyT (pour revue Moser, Wolf et al. 2004). Il a déjà été montré que la sur-expression de certaines RGS, limite la migration des lymphocytes B (Moratz, Kang et al. 2000; Reif and Cyster 2000; Moratz, Harrison et al. 2004; Moratz, Hayman et al. 2004). A partir d'expériences de RT-PCR quantitative nous avons étudié le niveau d'expression de tous les membres de la famille des RGS. Nous avons observé que le niveau des transcrits pour RGS-1, RGS-9 et RGS-16 est beaucoup plus important dans les Treg que les LyT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. D'autre part, nous avons montré que la migration des LyT

s'accompagne d'une baisse de l'expression de ces mêmes RGS. Ces résultats nous permettent de penser qu'il existe un mécanisme moléculaire dépendant des RCPG via les RGS pour réguler les propriétés de migration des différentes populations de LyT et notamment celles des Treg. L'absence d'Ac dirigés contre les RGS-1, -9 ou -16 ne nous a pas permis de vérifier la régulation du niveau d'expression de ces protéines. D'autre part, les souris RGS-1<sup>-/-</sup> (Moratz, Hayman et al. 2004) n'ont pas révélé des perturbations dans les propriétés des LyT et les souris déficientes pour RGS-9 et RGS-16 n'existent pas encore pour tester leur importance dans les propriétés des LyT. Cependant, nous avons pu étudier les animaux RGS-2<sup>-/-</sup> (Oliveira-Dos-Santos, Matsumoto et al. 2000) et RGS-4<sup>-/-</sup> (Grillet, Pattyn et al. 2005). Ces animaux ne présentaient aucune anomalie ni au niveau de la différenciation B ou T, ni au niveau du phénotype ou du nombre de lymphocytes B et T périphériques (résultats non publiés). Néanmoins, on peut imaginer que des expériences basées sur la fonctionnalité des LyT seraient plus intéressantes avec ces animaux. On peut aussi suspecter que les RGS peuvent être redondantes. C'est pourquoi, des croisements tels que RGS-2<sup>-/-</sup>.RGS-4<sup>-/-</sup> pourraient conduire à un phénotype plus intéressant.



## Résultats complémentaires

### Number matters: Lymphopenia determines homeostatic expansion of regulatory T cells.

N. Bosco<sup>\*</sup>, F. Agenès<sup>\*</sup>, J. Laurent, A. Rolink, R. Ceredig.

<sup>\*</sup> N.B. and F.A. contributed equally to this work.

A partir de chimères mixtes de moelles osseuses avec des ratios différents de précurseurs capables de générer des LyT (moelle osseuse sauvage) ou non (moelle osseuse  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$ ), les travaux de Almeida & al. (Almeida, Borghans et al. 2001) ont évalué la contribution de la production thymique sur la taille du compartiment de LyT périphériques. Ces travaux ont montré que la production thymique était largement excédentaire, ainsi lorsqu'on réduit la production thymique de 10 fois, on retrouvera un compartiment de LyT périphériques normal. Ce sont les mécanismes de prolifération homéostatique en périphérie qui interviennent principalement pour réguler la taille du compartiment de LyT périphériques. En deçà d'une réduction de 10 fois, on observe une lymphopénie T sévère parce que la prolifération homéostatique ne suffit plus à compenser le déficit de production thymique.

Le pré-TCR exprimé au stade DN3 est composé d'une chaîne  $\text{TCR}\beta$  et de la chaîne  $\text{pT}\alpha$  associées au complexe CD3. L'expression du pré-TCR constitue un point de contrôle important pour assurer la transition entre les stades DN et DP. Les souris déficientes pour la chaîne  $\text{pT}\alpha$  ont confirmé le rôle du pré-TCR dans la thymopoïèse : dans ces souris, on observe un blocage massif de la différenciation au stade DN3 entraînant une forte réduction de la cellularité thymique. Cependant, un petit nombre de thymocytes  $\text{pT}\alpha^{-}$  est capable de générer des cellules DP exprimant un  $\text{TCR}\alpha\beta$  et capables de se différencier vers le stade SP. Des LyT matures sont ensuite exportés à la périphérie. Les souris  $\text{pT}\alpha^{-/-}$  ont largement été utilisées pour étudier le rôle du pré-TCR dans la thymopoïèse (pour revue von Boehmer 2005). En revanche, il n'y a aucune étude sur le compartiment de LyT périphériques de ces souris. Dans ces animaux, la thymopoïèse est largement réduite avec 10 à 20 fois moins de SP que dans une souris sauvage. Assez logiquement, ces souris présentent une lymphopénie T chronique. La lymphopénie T entraîne souvent une rupture des mécanismes de tolérance et l'apparition de pathologies auto-immunes (pour revue Theofilopoulos, Dummer et al. 2001; Baccala and Theofilopoulos 2005; Marleau and Sarvetnick 2005). Les mécanismes à l'origine

de la rupture de tolérance périphérique ne sont pas encore caractérisés. En ce qui concerne les souris  $pT\alpha^{-/-}$ , aucune anomalie n'a été rapportée ou identifiée. Les travaux témoignant du rôle des cellules T régulatrices (Treg) sur le contrôle de la tolérance périphérique sont de plus en plus nombreux depuis une dizaine d'années (pour revue Shevach 2002; Sakaguchi 2004). Nous avons imaginé que les Treg pouvaient exercer un rôle crucial dans les situations de lymphopénie T. Nous avons donc souhaité caractériser les populations de LyT périphériques dans les souris  $pT\alpha^{-/-}$ . Quels sont leurs phénotypes ? Leurs fonctions sont-elles altérées ? Nous nous sommes particulièrement concentrés sur les cellules Treg. Les principaux résultats obtenus sont présentés ci-dessous, les figures correspondantes sont regroupées à la fin de cette section du chapitre de résultats.

### **Les animaux $pT\alpha^{-/-}$ présentent un blocage de la différenciation T et une lymphopénie T périphérique.**

Nous avons analysé les profils CD4 et CD8 dans le thymus, la rate et les ganglions des animaux  $pT\alpha^{-/-}$  et contrôles (Cf figure 2.11). Le blocage de la différenciation thymique dans les animaux  $pT\alpha^{-/-}$  se traduit par une expansion relative des DN (~70% des thymocytes totaux) comparé aux animaux contrôles (~1% des thymocytes totaux). Le blocage de la différenciation dans les animaux  $pT\alpha^{-/-}$  est partiel. En effet, on retrouve des DP et des SP, mais aussi des LyT en périphérie. Cependant, le nombre de LyT périphériques  $CD4^{+}$  et  $CD8^{+}$  est largement réduit (10 fois moins que la normale). La lymphopoïèse B n'est pas affectée dans les animaux  $pT\alpha^{-/-}$  et logiquement le nombre et le phénotype des LyB est normal (Cf figure 2.11 et résultats non montrés).

### **Le phénotype des LyT dans les souris $pT\alpha^{-/-}$ est largement altéré.**

Dans les chimères de moelle osseuse réalisées par Almeida & al. (Almeida, Borghans et al. 2001), lorsque les animaux étaient lymphopéniques, la majorité des LyT présentait un phénotype «mémoire-activé» caractérisé par un niveau faible d'expression de CD45RB. Par analogie, nous avons observé que la majorité des LyT  $CD4^{+}$  et  $CD8^{+}$  présentait un phénotype «mémoire-activé» dans les animaux  $pT\alpha^{-/-}$  (Cf figure 2.12). Dans les souris contrôles, les LyT sont majoritairement de type naïfs ( $CD4^{+} CD44^{low} CD45RB^{high} CD69^{-} CD127^{+}$  ou  $CD8^{+} CD44^{low} CD45RB^{high} CD69^{-} CD122^{low} Ly6C^{+/-}$ ). Contrairement aux souris contrôles, dans les

souris  $pT\alpha^{-/-}$  les LyT sont de type « mémoire-activé » ( $CD4^{+} CD44^{high} CD45RB^{low} CD69^{+/-} CD127^{+}$  ou  $CD8^{+} CD44^{high} CD45RB^{low} CD69^{+/-} CD122^{+} Ly6C^{high}$ ). Lors des expériences de transferts adoptifs, les lymphocytes transférés prolifèrent et adoptent un phénotype « mémoire-activé » (pour revue Ge, Hu et al. 2002). Cette conversion de phénotype est caractéristique des cellules qui se multiplient au cours de la PIL (Prolifération Induite par la Lymphopénie) et permet de recoloniser les compartiments lymphoïdes. Les souris  $pT\alpha^{-/-}$  présentent une lymphopénie importante dû à un défaut de production thymique et une activité de prolifération homéostatique importante en périphérie (résultats non montrés). Par conséquent, la conversion de phénotype des LyT serait une conséquence logique de la PIL. De plus, nous avons observé une plus importante proportion de lymphocytes  $CD4^{+}CD25^{+}$  (~20-30% des LyT  $CD4^{+}$ ) dans les souris  $pT\alpha^{-/-}$  contrairement aux souris contrôles où cette population est plus minoritaire (~5-10% des LyT  $CD4^{+}$ ). Nous reviendrons la dessus plus loin (Cf figures 2.12 et 2.15).

### **Les propriétés fonctionnelles des LyT dans les souris $pT\alpha^{-/-}$ sont normales.**

Plusieurs études ont suggéré que la conversion phénotypique LyT naïf→mémoire-activé au cours de la PIL, s'accompagne aussi de l'acquisition de propriétés fonctionnelles caractéristiques (Kieper and Jameson 1999; Goldrath, Bogatzki et al. 2000; Murali-Krishna and Ahmed 2000). En effet, dans des situations de lymphopénie, les LyT présentent une activité de synthèse de cytokine, notamment l'IFN $\gamma$  plus importante. On parle même de cellules mimant les LyT mémoires. Nous avons pu vérifier cela par des expériences de stimulation *in vitro* à la PHA. Ainsi, nous avons observé que les LyT des souris  $pT\alpha^{-/-}$  et contrôles répondent normalement à une stimulation *in vitro* en modifiant leur phénotype (augmentation de l'expression de CD25, CD44 et CD69) mais aussi en proliférant et en synthétisant de IL-2, de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  (Cf figure 2.13 et résultats non montrés). Néanmoins, l'activité de synthèse en IFN $\gamma$  et en TNF $\alpha$  est plus importante pour les LyT issus des souris  $pT\alpha^{-/-}$ .

De nombreux travaux suggèrent que dans des situations de lymphopénie, la réponse immune est moins efficace. Ainsi par exemple, les travaux de La Gruta N. & al. (La Gruta, Driel et al. 2000) ont observé une expansion oligoclonale des LyT périphériques après thymectomie. Ces « trous » dans le répertoire ont pour conséquence de limiter une réponse

immune T-dépendante anti-HEL chez la souris. Le même phénomène a été mis en évidence chez l'homme. Le vieillissement entraîne une réduction de la thymopoïèse, qui a pour conséquence une baisse de la diversité du répertoire des LyT et ceci peut être à l'origine d'une réduction de l'efficacité des réponses immunes T dépendantes (pour revue Linton and Dorshkind 2004). Chez les souris thymectomisées en période néonatale, la réduction du compartiment T est beaucoup plus légère (<50%) (La Gruta, Driel et al. 2000) que chez les animaux  $pT\alpha^{-/-}$  (~90%) (Cf figure 2.11). Nous avons donc entrepris des expériences d'immunisation T-dépendante dans les animaux  $pT\alpha^{-/-}$  et contrôles. De manière assez surprenante, nos résultats montrent que même dans une situation où seulement 10% du compartiment de LyT périphérique est présent la réponse immune T-dépendante anti-OVA est efficace (Cf figure 2.14). Elle se traduit par une augmentation du titre d'Ac anti-OVA et de manière similaire aux animaux contrôles. De plus, nous avons observé une génération normale de centres germinatifs dans les follicules spléniques des animaux  $pT\alpha^{-/-}$  ou contrôles immunisés.

### **Les souris $pT\alpha^{-/-}$ sont enrichies en Treg.**

De nombreuses études suggèrent que la lymphopénie favorise l'apparition de pathologies auto-immunes. C'est ce qu'on observe après thymectomies (pour revue Gleeson, Toh et al. 1996) mais aussi dans certaines pathologies générant des situations de lymphopénies chroniques comme le VIH (pour revue Zandman-Goddard and Shoenfeld 2002). King C. & al. (King, Ilic et al. 2004) ont apporté, voilà peu, des explications moléculaires à ce phénomène. Ces travaux se sont intéressés au développement du diabète auto-immun dans le modèle de souris NOD. Ces souris sont légèrement lymphopéniques et développent la pathologie aux alentours de 20-30 semaines. Cependant, si les souris NOD sont immunisées ou injectées avec un grand nombre de LyT par transfert adoptif, elles ne développent aucun signe de diabète. Ces résultats ont conduit les auteurs à suspecter que la PIL favorise l'expansion de LyT pathogènes auto-réactifs qui élimineront les cellules- $\beta$  du pancréas. Le locus impliqué dans le développement du diabète auto-immun porte les gènes de l'IL-2 et de l'IL-21 (Denny, Lord et al. 1997; Wicker 1997). En règle générale, la prolifération homéostatique permet l'expansion et la survie de l'ensemble des clones T avec des cytokine comme l'IL-7. Chez les souris NOD, l'IL-21 permet une expansion préférentielle de clone T auto-réactifs souvent IL-21R<sup>+</sup>. King C. & al. montrent que l'IL-21



est surexprimée dans les souris NOD et favorise l'expansion de LyT autoréactifs avec des propriétés effectrices mais pas leur survie. Ces cellules vont initier la destruction des cellules du pancréas- $\beta$  et favoriser le développement du diabète (King, Ilic et al. 2004).

Dans le cas des souris  $pT\alpha^{-/-}$ , nous n'avons jamais observé de signes visibles de pathologies auto-immunes et même chez des souris âgées de plus de 1 an. Aucune mortalité exagérée dans la colonie n'a été observée et des expériences d'EAE (Encéphalite Auto-immune Expérimentale) menées sur des souris contrôles ou  $pT\alpha^{-/-}$  n'ont pas révélé de différences significatives entre les deux groupes dans l'incidence ou dans la gravité de la pathologie (résultats non montrés). Néanmoins, ces souris présentaient la particularité d'avoir une proportion plus élevée de LyT  $CD4^{+}CD25^{+}$  au niveau du thymus mais aussi dans les organes lymphoïdes périphériques (Cf figure 2.15). Les LyT  $CD4^{+}CD25^{+}$  ou Treg ont été décrits initialement comme une population de LyT à l'origine de la tolérance périphérique. Nous avons donc cherché à caractériser les propriétés de ces cellules dans les animaux  $pT\alpha^{-/-}$ . Phénotypiquement, les cellules  $CD4^{+}CD25^{+}$  des souris  $pT\alpha^{-/-}$  présentent toutes les caractéristiques des Treg. De manière comparable aux souris contrôles, les LyT  $CD4^{+}CD25^{+}$  sont  $CD5^{High}CD45RB^{low}CD62L^{+/-}CD69^{+/-}CD103^{+/-}$  et  $CTLA-4^{+}$  (Résultats non montrés). Présentant une lymphopénie T importante, les tests de suppression *in vitro* après tri des cellules T  $CD4^{+}CD25^{+}$  sont difficilement réalisables avec les souris  $pT\alpha^{-/-}$ . Cependant, il a été montré que les Treg expriment spécifiquement le Facteur de Transcription (FT) FOXP3 (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori, Nomura et al. 2003; Khattri, Cox et al. 2003; Hori and Sakaguchi 2004). De plus, la transduction rétrovirale de ce FT dans des LyT  $CD4^{+}$  ou  $CD8^{+}$  est à l'origine de l'activité de suppression des LyT. Nous avons donc réalisé des marquages contre ce FT dans des LyT  $CD4^{+}CD25^{+}$  issus des souris contrôles et  $pT\alpha^{-/-}$ . Indépendamment de l'origine des LyT testés, les cellules  $CD4^{+}CD25^{+}$  du thymus ou de la rate sont  $FOXP3^{+}$  (Cf figure 2.15). L'ensemble de ces résultats nous permet donc de penser que les LyT  $CD4^{+}CD25^{+}$  des souris contrôles et  $pT\alpha^{-/-}$  sont similaires et présentent les propriétés classiques de suppression des Treg.

### **La lymphopénie favorise le développement et la survie périphérique des Treg.**

Le thymus et les organes lymphoïdes périphériques des souris  $pT\alpha^{-/-}$  sont enrichis en Treg. Nous nous sommes d'abord demandé si ce phénotype était une propriété intrinsèque ou

extrinsèque aux LyT des souris  $pT\alpha^{-/-}$ . C'est pourquoi nous avons réalisé différentes combinaisons de chimères mixtes de moelles osseuses pour reconstituer des souris Rag-2<sup>-/-</sup> irradiées (Cf figure 2.16). Comme attendu, deux à trois mois après la greffe, les chimères réalisées avec 100% de la moelle provenant des souris WT ont un profil de différenciation thymique normal et une augmentation claire de la cellularité du thymus. On retrouve aussi des LyT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en grand nombre dans la rate. Parmi, les thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et LyT périphériques CD4<sup>+</sup> environ 1-2% et 5-10% respectivement sont CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Les chimères réalisées avec 100% de la moelle provenant des souris  $pT\alpha^{-/-}$  ont un profil de différenciation thymique altéré et une cellularité du thymus comparable aux animaux  $pT\alpha^{-/-}$  non manipulés (Résultats non montrés). Les résultats obtenus avec les chimères mixtes 50% WT (Ly5.1) : 50%  $pT\alpha^{-/-}$  (Ly5.2) étaient plus surprenants. Nous avons observé une exclusion des précurseurs issus de la moelle osseuse des souris  $pT\alpha^{-/-}$  générant peu de SP au profit des précurseurs issus de la moelle osseuse WT produisant plus de SP. Ceci s'est traduit à la périphérie par un nombre normal de LyT (comparable aux chimères 100% WT) provenant préférentiellement de la moelle osseuse WT (~95%) (Cf figure 2.17 et résultats non montrés). A l'inverse, pour les LyB nous avons obtenu un chimérisme de 50%, correspondant au niveau de chimérisme des précurseurs de LyB injectés. Cependant, dans les chimères mixtes 50% WT : 50%  $pT\alpha^{-/-}$  où le nombre de LyT total est comparable à une souris contrôle non manipulée, la proportion de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> au sein des LyT CD4<sup>+</sup> était de ~10% pour les LyT WT ou  $pT\alpha^{-/-}$  (Cf figure 2.17). Basé sur ces résultats, nous pouvons donc exclure un avantage intrinsèque des précurseur  $pT\alpha^{-/-}$  à générer des LyT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

Ces résultats nous ont ensuite conduit à imaginer que le nombre de LyT périphériques détermine leur phénotype et leur fonction. Dans une situation de lymphopénie, il y'a plus de LyT « mémoire-activé » mais aussi plus de cellules Treg. A partir de chimères mixtes de moelles osseuses, Almeida & al. (Almeida, Borghans et al. 2001) ont montré que la variation du nombre de progéniteurs capables de générer des LyT au niveau du thymus, a un effet sur le nombre de LyT périphériques. Cependant, peu d'explications ont été fournies dans ce travail pour comprendre comment le compartiment de LyT périphériques s'adapte à la réduction de la production thymique. Les auteurs ont montré qu'il y'avait une stimulation de l'export thymique de LyT matures dans les conditions de lymphopénies et ont émis l'hypothèse que la prolifération et la survie périphérique des lymphocytes sont augmentées. En utilisant ce système expérimental, nos expériences ont démontré que :

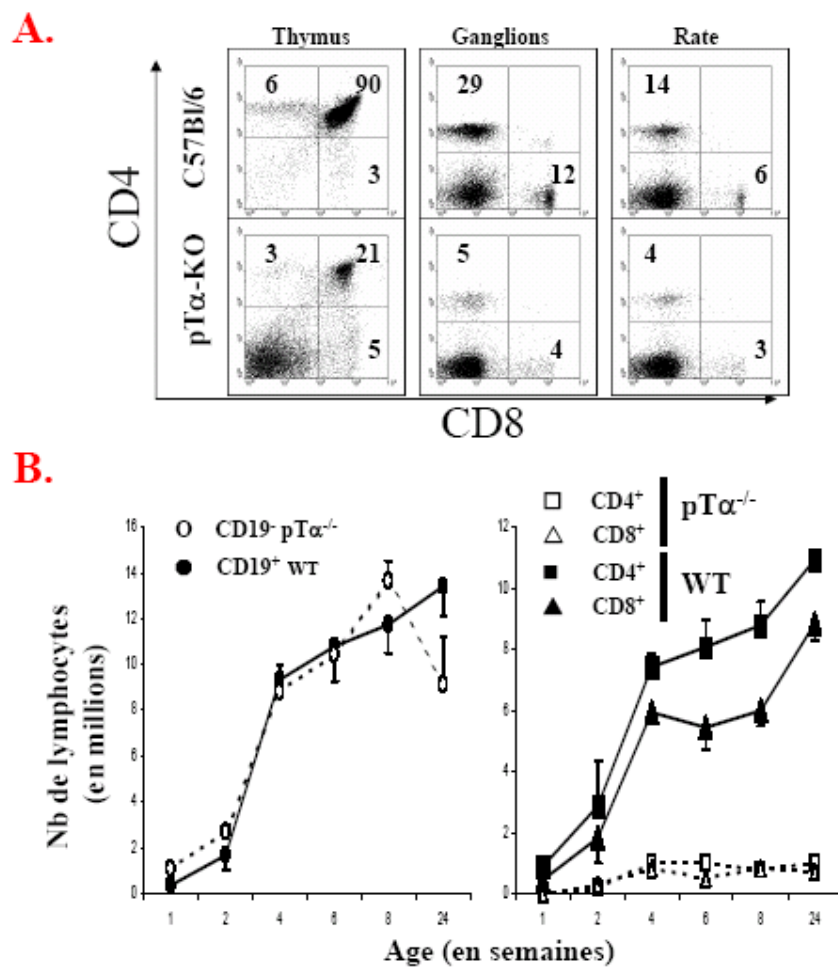
♦ Moins le nombre de LyT périphériques est élevé plus le pourcentage de cellules en prolifération (Ki-67<sup>+</sup>) est important quelque soit la population de LyT (Cf figure 2.18).

♦ La lymphopénie n'entraîne pas d'augmentation de la survie périphérique des LyT (d'après le niveau de Bcl-2 exprimé), au contraire, les cellules sont différenciées et une proportion plus importante entre en apoptose (Annexine V<sup>+</sup>) (Résultats non montrés).

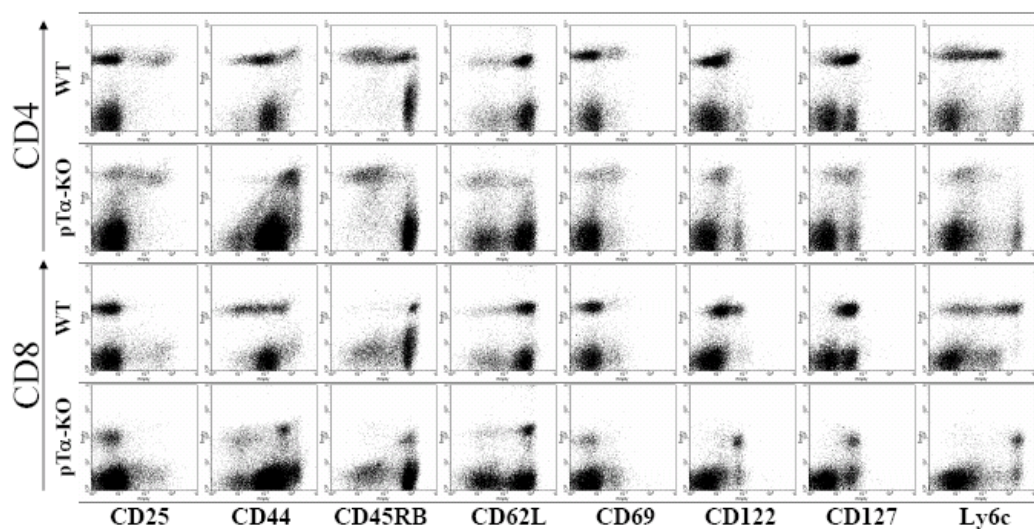
♦ Enfin, nous avons pu observer que plus le nombre de LyT périphériques est réduit plus la proportion de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> est importante. Les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ont un phénotype classique de Treg (Cf figure 2.19).

Dans les chimères mixtes de moelles osseuses WT (Ly5.1) : TCR $\alpha^{-/-}$  (Ly5.2) reconstituées avec 1-5% de moelle osseuse WT, nous reproduisons rigoureusement le phénotype des souris pT $\alpha^{-/-}$ . La thymopoïèse est très réduite, peu de lymphocytes T sont retrouvés en périphérie et 20-30% des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. A l'heure actuelle, nous cherchons à expliquer pourquoi il existe une génération/persistance préférentielle des Treg dans les organes lymphoïdes périphériques des souris lymphopéniques (chimères ou pT $\alpha^{-/-}$ ). Il a été montré que le thymus n'est pas la seule source de cellules Treg (pour revue Taams and Akbar 2005). Certains LyT CD4<sup>+</sup> périphériques sont capables de se différencier en Treg. Des travaux récents ont montré que la PIL entraîne une différenciation de certains LyT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en LyT anergiques et suppressifs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Curotto de Lafaille, Lino et al. 2004). De plus, nous savons que l'IL-2 produite par les LyT au cours de la PIL, favorise la survie périphérique des Treg (Taams, Smith et al. 2001; Bayer, Yu et al. 2005; Setoguchi, Hori et al. 2005). Dans les souris pT $\alpha^{-/-}$ , nous imaginons qu'un tel phénomène puisse expliquer l'accumulation de cellules Treg en périphérie. En effet, les souris pT $\alpha^{-/-}$  contiennent aussi une proportion importante de lymphocytes T en prolifération comme les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> (Cf figure 2.15). Ces LyT sont des lymphocytes T activés qui produisent de l'IL-2 et qui pourraient entretenir la génération de Treg en périphérie. Par contre ceci n'explique pas l'excès de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que nous observons au niveau du thymus. Pour le moment nous favorisons l'hypothèse d'une recirculation importante des lymphocytes T périphériques CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> vers le thymus des souris pT $\alpha^{-/-}$ . Des travaux sont en cours pour tester différentes hypothèses concernant leur(s) origine(s).

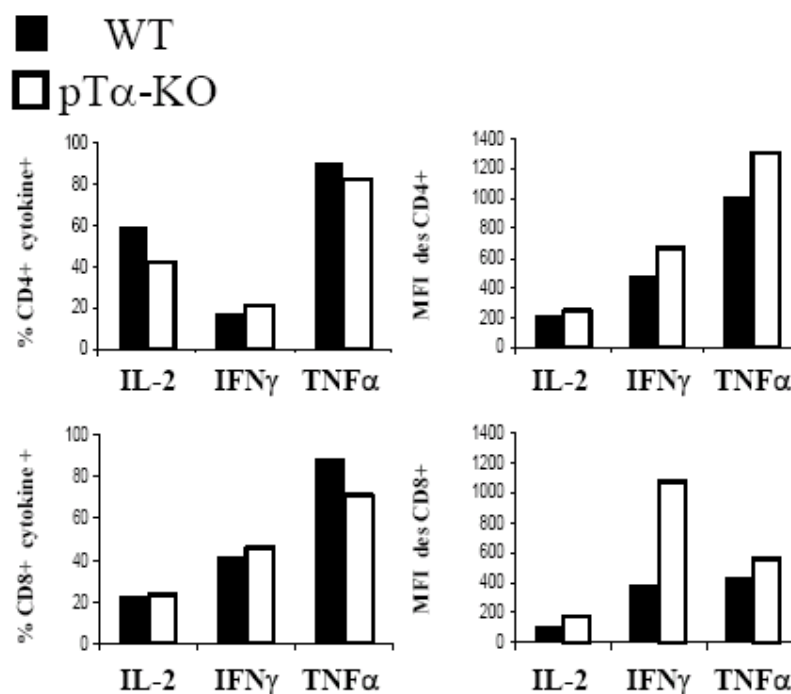
Pour conclure, nous pensons que le nombre de LyT périphériques conditionne leurs natures et leurs fonctions. Nous proposons qu'il existe en quelque sorte un mécanisme physiologique qui favorise mais aussi contrôle la sélection périphérique des cellules les plus efficaces. Nous proposons un modèle du type « **less but the best** ». Ainsi dans une situation de lymphopénie la majorité des LyT ont un phénotype et des fonctions effectrices. Ceci permet même dans des conditions extrêmes de maintenir un système immunitaire moins spécifique mais plus sensible. Dans ce modèle, il serait assez normal de développer des pathologies auto-immunes au moindre stress déclenchant un état immunodéprimé. Pour réduire les inconvénients de ce genre de situation, il semblerait qu'il existe une certaine plasticité du compartiment de LyT et notamment celui des Treg. Aussi, jusqu'à un tiers des LyT CD4<sup>+</sup> peut adopter des propriétés régulatrices. Les mécanismes à l'origine de cette boucle de régulation ne sont pas encore clairs. Néanmoins, des évidences suggérant l'existence de cette boucle de régulation du type « less but the best » existe déjà. En effet, l'étude de patients VIH<sup>+</sup> a montré à travers leurs numérations sanguines que la lymphopénie induite par le virus a pour conséquence une augmentation de la proportion de Treg parmi les LyT CD4<sup>+</sup> (Kinter, Hennessey et al. 2004; Weiss, Donkova-Petrini et al. 2004; Andersson, Boasso et al. 2005). Les raisons à ce phénomène sont encore obscures. On peut imaginer que les patients qui ont le plus de Treg parmi leur CD4<sup>+</sup> sont significativement moins sujets au développement de pathologies auto-immunes souvent associées à la phase terminale du VIH. Cette hypothèse pourrait être testée à travers une analyse statistique de corrélation entre l'évolution de la pathologie et la numération sanguine des patients.



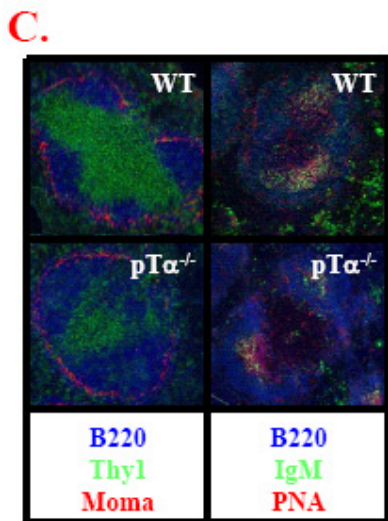
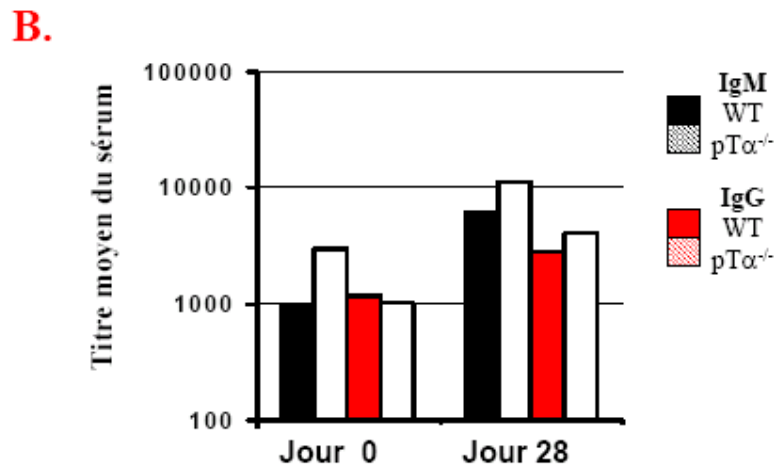
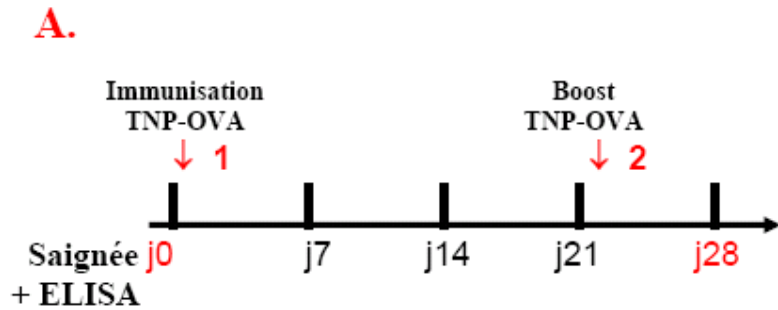
**Figure 2.11 :** Thymopoïèse et lymphopoïèse chez les souris pTα<sup>-/-</sup> et contrôles (C57BL/6). Un profil représentatif CD4 et CD8 dans le thymus, les ganglions et la rate est représenté en (A). L'ontogénie et la cellularité en LyB et LyT d'un pool de ganglions (inguinaux, axillaires et brachiaux) chez les souris pTα<sup>-/-</sup> et contrôles sont représentées en (B). n=3-7 animaux par point.



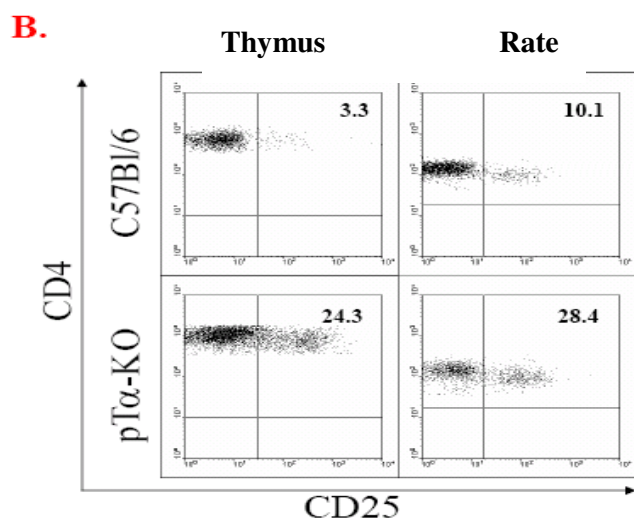
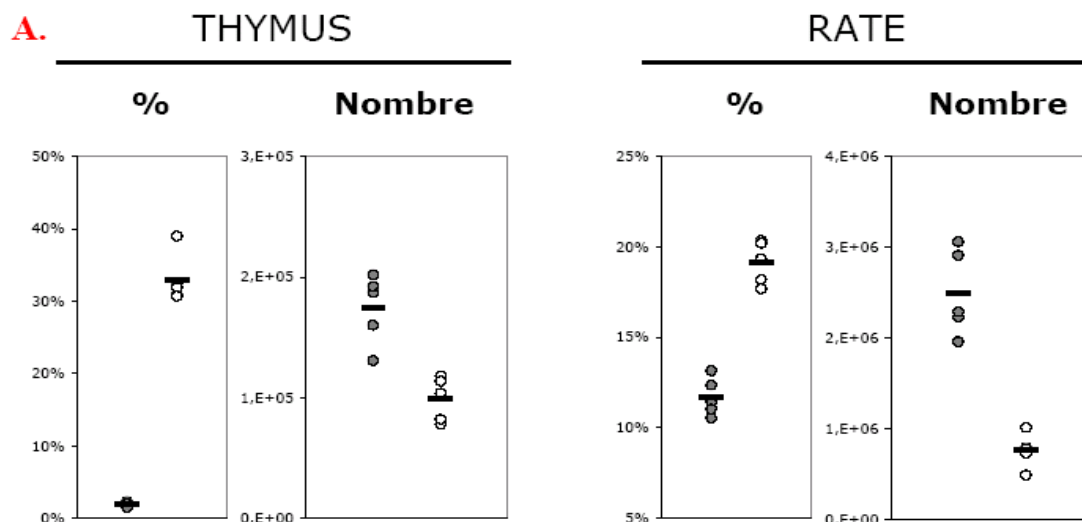
**Figure 2.12 :** Analyse par cytométrie en flux 4 couleurs du phénotype des splénocytes CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> des souris contrôles ou pTα<sup>-/-</sup>.



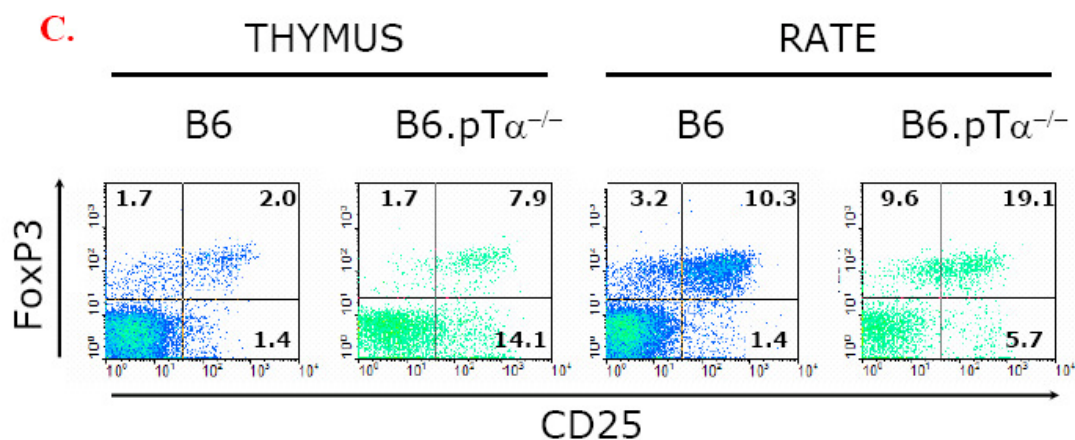
**Figure 2.13 :** Niveau d'expression en cytokines des splénocytes CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Les splénocytes des souris contrôles (en noir) ou pTα<sup>-/-</sup> (en blanc) ont été stimulé 4h en culture à la PHA. Après fixation et marquage intracellulaire le niveau d'expression en % de cellules positives ou en moyenne de fluorescence(MFI) sont indiqués sur les histogrammes de gauche ou de droite respectivement.



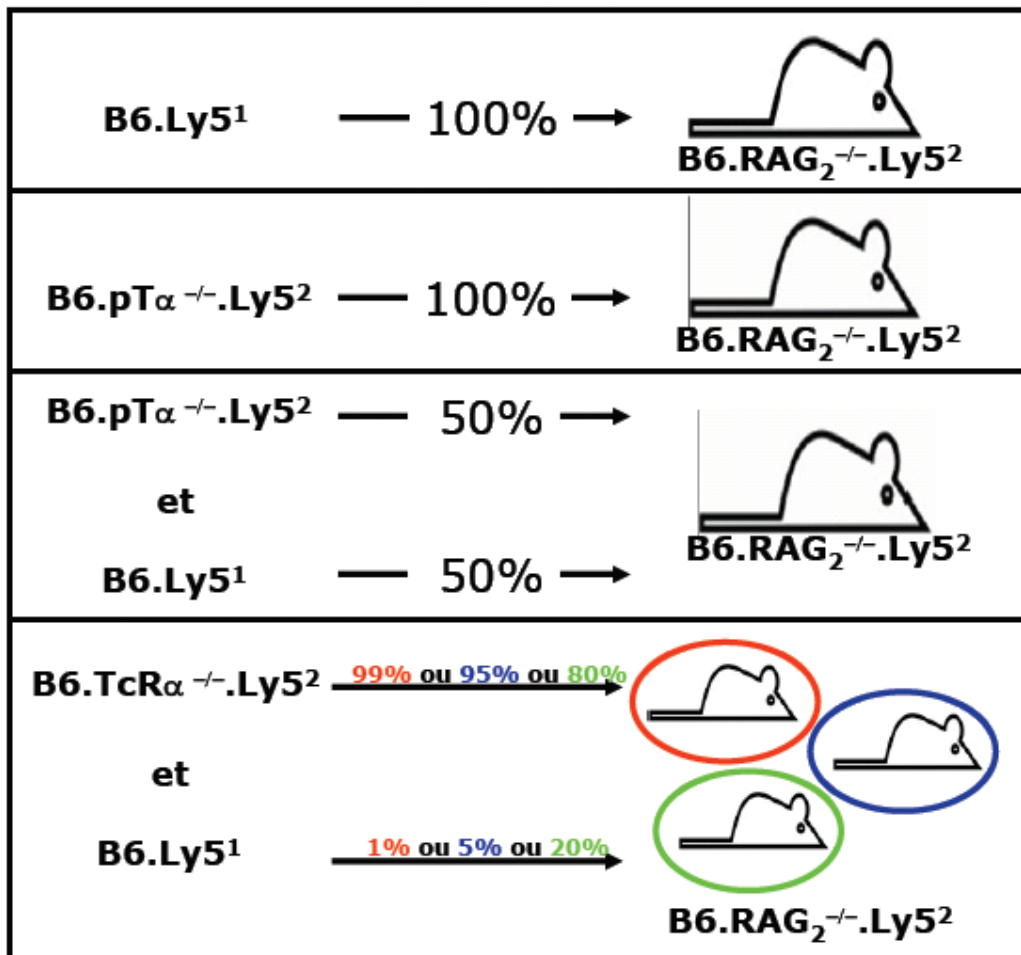
**Figure 2.14 :** Evaluation de la réponse immune T-dépendante chez les souris contrôles ou pTα<sup>-/-</sup>. (A) Après une première saignée, les souris ont été immunisées à J0 avec 100μg i.v. de TNP-OVA. Un boost a été réalisé à J21 et les souris ont été à nouveau saignées à J28 (Boost +7). (B) Le titre d'Ac IgG ou IgM anti-TNP a été évalué par ELISA à J0 et J28. On observe une augmentation d'un facteur de 10 du titre d'Ac spécifiques anti-TNP quelque soit les souris immunisées. (C) Analyse par microscopie confocale des follicules spléniques avant (à gauche) et après (à droite) immunisation. On note une réduction de la zone T dans les souris pTα<sup>-/-</sup>, cependant les souris contrôles et pTα<sup>-/-</sup> sont capables de générer des centres germinatifs (PNA<sup>+</sup>IgM<sup>++</sup>) au cours d'une réponse T-dépendante.



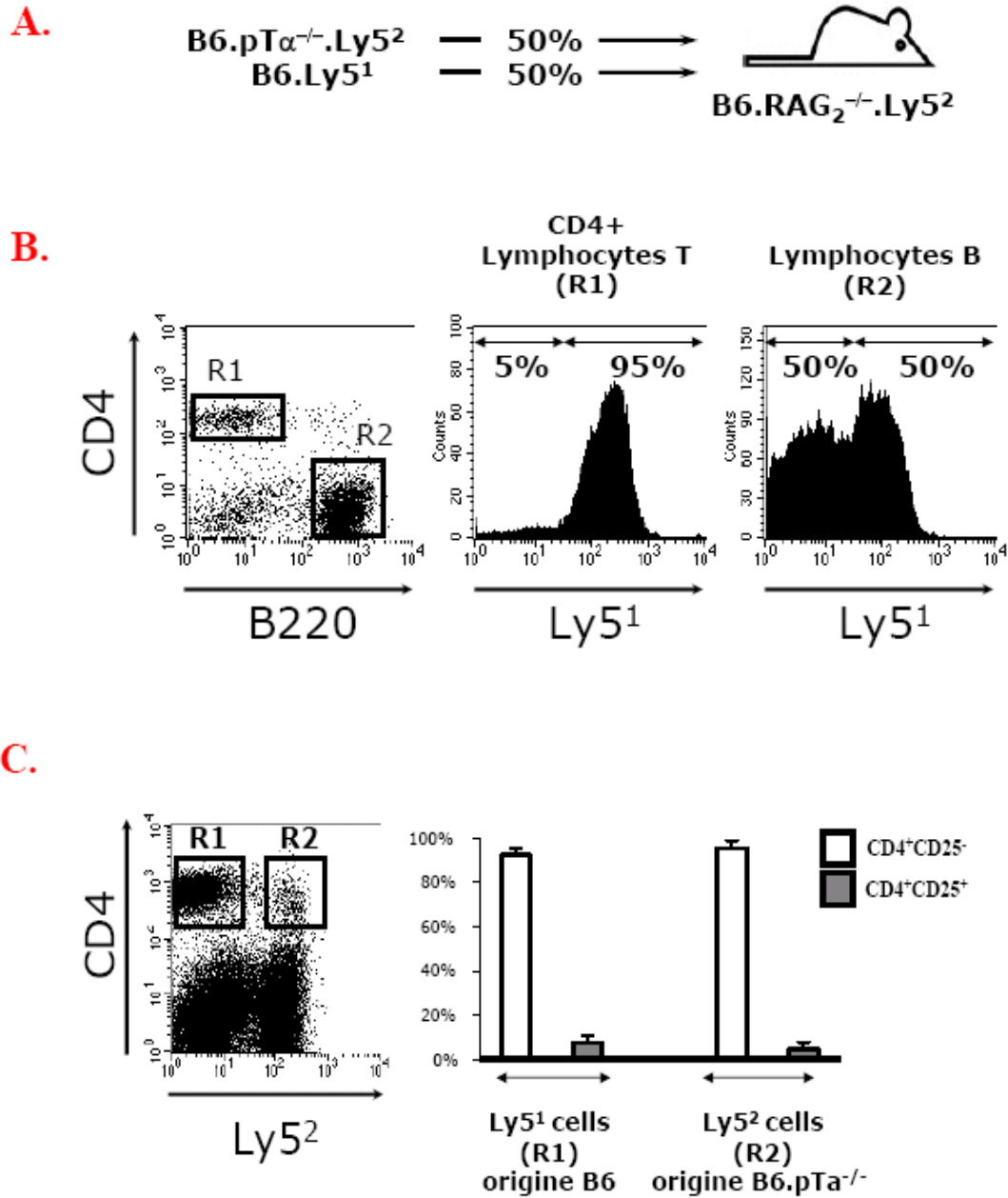
**Figure 2.15 :** Les souris  $pT\alpha^{-/-}$  sont enrichies en Treg. (A) Nombres et pourcentages de cellules  $CD4^+CD25^+$  du thymus ou de la rate dans les animaux contrôles ou  $pT\alpha^{-/-}$ . (B) Profils caractéristiques CD4 contre CD25 dans le thymus ou la rate des animaux contrôles ou  $pT\alpha^{-/-}$ . Les chiffres représentent le % de cellules  $CD4^+CD25^+$ . (C) Profil d'expression de FOXP3 par les cellules  $CD4^+$ . Les chiffres représentent les pourcentages compris dans chaque quadrant. Ce sont majoritairement les cellules  $CD4^+CD25^+$  qui sont FOXP3<sup>+</sup>.



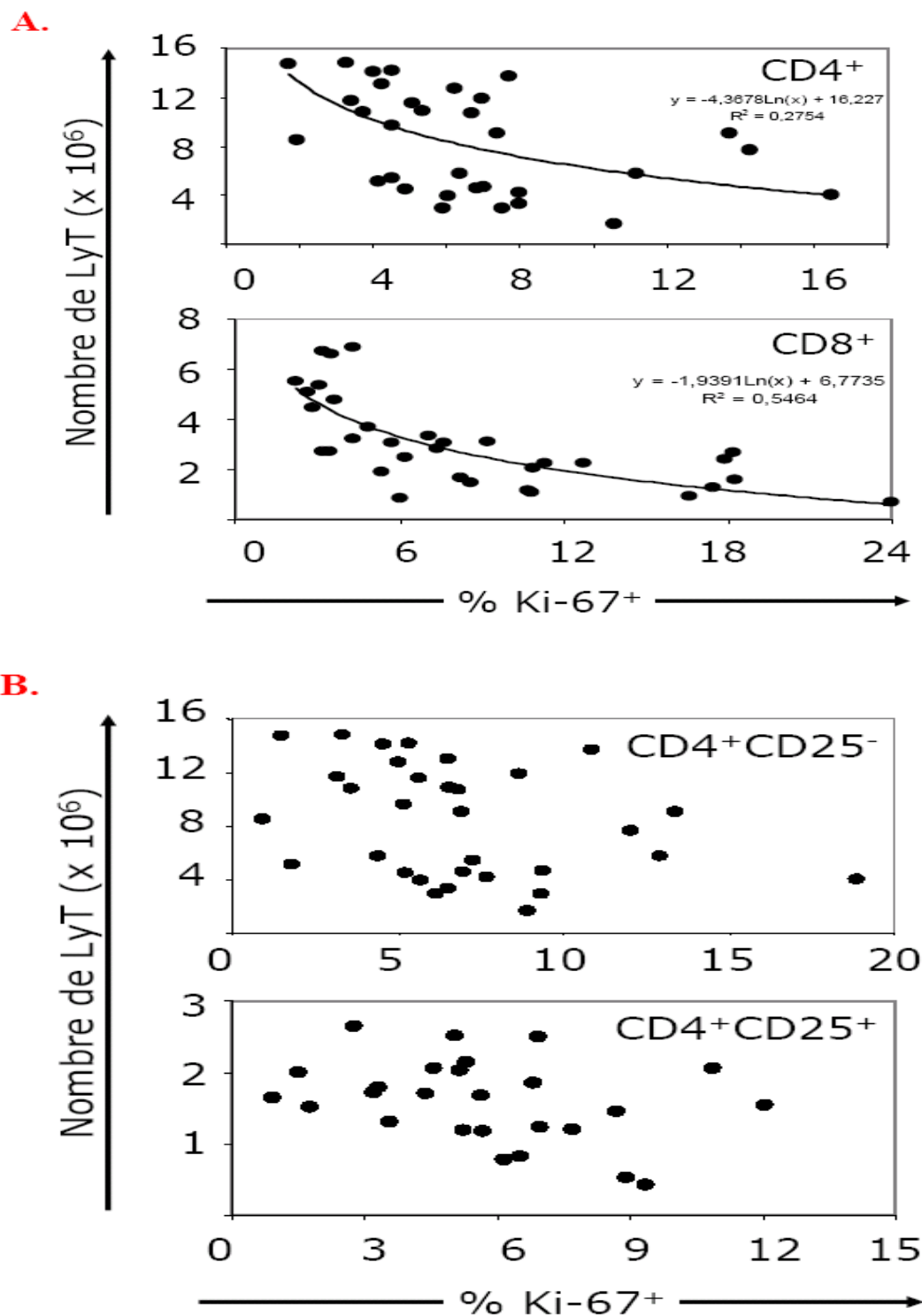




**Figure 2.16 :** Représentation schématique des différentes combinaisons de chimères ou de chimères mixtes de moelles osseuse réalisées. Dans le cas des chimères mixtes, les ratios provenant de chaque donneur sont indiqués. Pour discriminer l'origine des cellules obtenus après la greffe et la différenciation des précurseurs hématopoïétiques qu'elle contient, chacun des donneurs porte un marqueur allotypique distinct. Les receveurs utilisés sont des souris Rag-2<sup>-/-</sup> irradiées à 950 rads. L'analyse des souris reconstituées a été réalisée ~3 mois après la greffe.

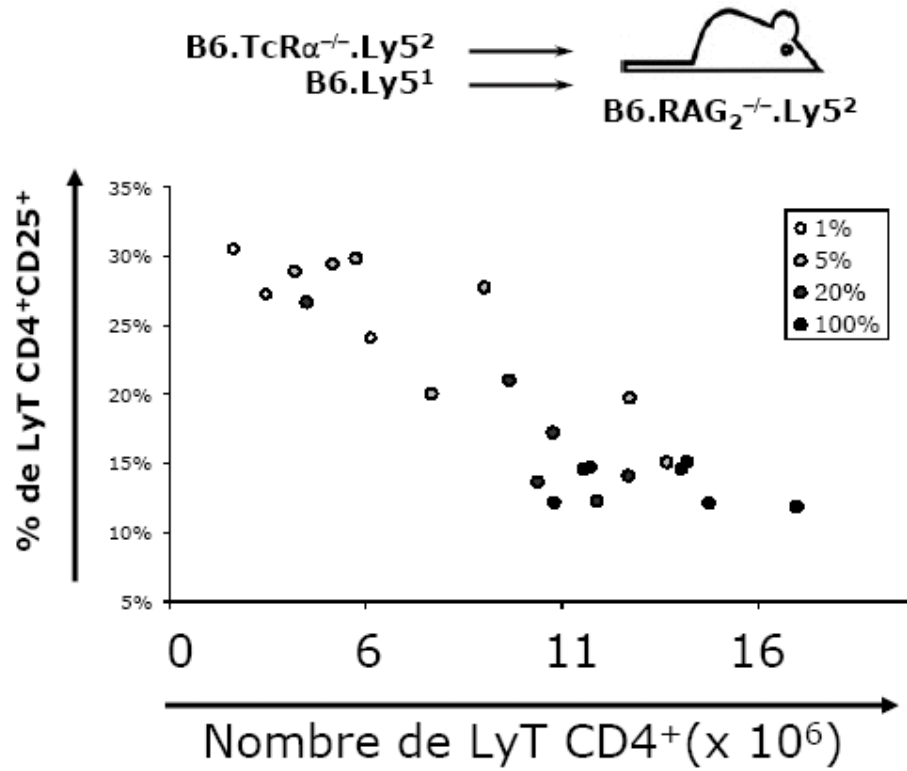


**Figure 2.17 :** Analyse des chimères mixtes de moelles osseuses. (A) Représentation schématique de la greffe réalisée. (B) Analyse représentative par cytométrie en flux 4 couleurs des splénocytes d'une souris reconstituée 3 mois après la greffe. Les marqueurs allotypiques portés par les LyB et T permettent de déterminer leurs origines respectives. La majorité des LyT CD4<sup>+</sup> proviennent de la souris contrôle (Ly5<sup>1</sup>), contrairement aux LyB (B220<sup>+</sup>) qui proviennent de manière égale de la souris contrôle (Ly5<sup>1</sup>), ou pTa<sup>-/-</sup> (Ly5<sup>2</sup>). (C) Les % de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ou CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> parmi les cellules CD4<sup>+</sup>Ly5<sup>1</sup> ou CD4<sup>+</sup>Ly5<sup>2</sup> sont représentés sur les histogrammes de gauches.

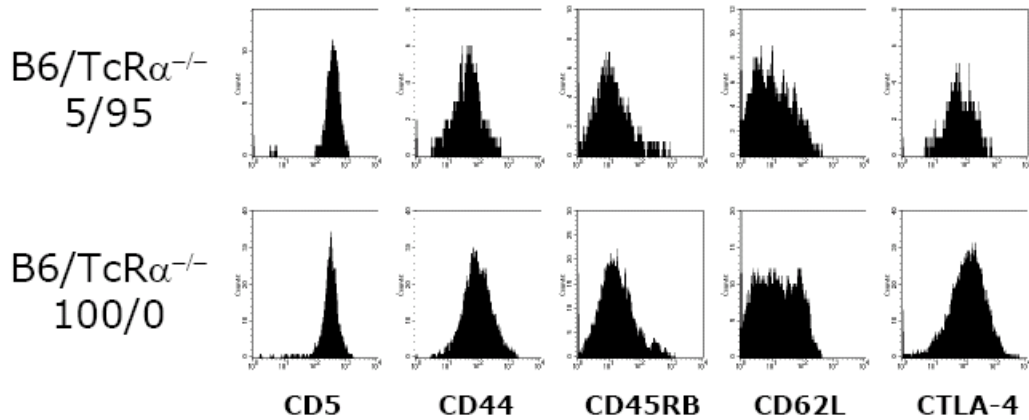


**Figure 2.18 :** Niveau d'expression intracellulaire de Ki-67 (%) en fonction du nombre total de cellules T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (A) ou CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> et CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (B). L'équation de la courbe de tendances et le coefficient de corrélation obtenus pour les LyT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont indiqués en (A).

**A.**



**B.**



**Figure 2.19 :** La lymphopénie entraîne une expansion relative des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (A) Représentation schématisée des greffes réalisées. (A) % de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en fonction du nombre total de cellules CD4<sup>+</sup> de la rate. (B) Analyse phénotypique représentative par cytométrie en flux des splénocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de souris partiellement (5%, histogrammes du haut) ou totalement (100%, histogrammes du bas) reconstituées 3 mois après la greffe.

## **Chapitre 3 : Discussion et Perspectives**



L'IL-7 est une cytokine pléiotropique non-redondante. Pour caractériser ses rôles dans le développement et l'homéostasie des lymphocytes et plus particulièrement des LyT nous avons réalisé différents modèles de souris IL-7 Tg. Les trois premiers articles de ce manuscrit et les expériences complémentaires associées nous ont permis de dresser une vision d'ensemble quant aux rôles de l'IL-7 dans la thymopoïèse ou encore la prolifération homéostatique. C'est ce dont nous discuterons ici, nous donnerons également les perspectives soulevées par ces travaux.

## **1. IL-7 et thymopoïèse**

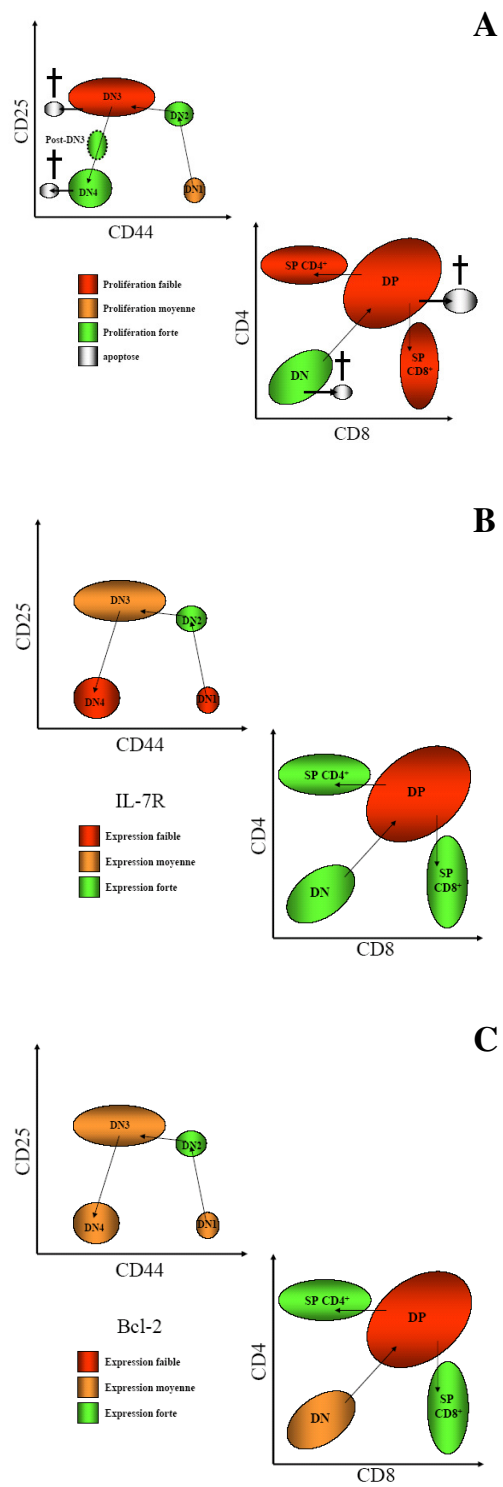
### *La situation chez l'adulte*

La différenciation des LyT au niveau du thymus est un mécanisme hautement régulé. Un défaut de différenciation a souvent de graves conséquences sur la taille du thymus et son activité, et entraîne souvent une lymphopénie T périphérique. En utilisant les techniques habituelles d'exclusion phénotypique par cytométrie en flux, la caractérisation des compartiments DN n'est pas évidente et rigoureuse (pour revue Ceredig and Rolink 2002). Afin d'obtenir un profil précis des phases précoces du développement thymique, nous avons développé une nouvelle approche pour l'analyse des thymocytes. L'importance de cette approche dans la définition des DN1 et DN2 a été souligné et maintenant cette approche est assez souvent reprise dans la littérature. Par exemple la définition rigoureuse des DN1 a permis récemment de déterminer que cette population est restreinte uniquement à la lignée T (Balciunaite, Ceredig et al. 2005).

Afin de caractériser le rôle de l'IL-7 dans la différenciation thymique, nous avons principalement réalisé des expériences de marquage intracellulaire anti-Bcl-2 et de cinétique de prolifération des thymocytes après marquage *in vivo* au BrdU dans des souris IL-7Tg ou contrôles. Il y'a une certaine corrélation entre le profil d'expression de l'IL-7R, le niveau d'expression de Bcl-2 par les thymocytes et leur activité de prolifération au cours de la thymopoïèse (Cf figure 3.1). Cependant, nous n'avons pas observé d'altérations majeures de la thymopoïèse dans notre modèle de souris sur-exprimant l'IL-7. Pourtant, certains travaux autorisent à croire que l'IL-7 exerce un effet dose-dépendant sur la thymopoïèse (El Kassas, Lucas et al. 2004). A des doses importantes la survie des DN est augmentée mais pas leur prolifération. Ainsi on observe une augmentation des populations DP et SP. Par contre, à des

doses **très** importantes, l'IL-7 exerce toujours un effet de survie sur les DN, mais cette fois la prolifération des DN est largement réduite et entraîne une baisse de passage DN→DP qui explique une réduction significative de la cellularité thymique. A partir de notre modèle, nous n'avons pas reproduit ces résultats. La thymopoïèse est normale, malgré un niveau d'expression relatif encore plus important de l'IL-7. Les différentes constructions utilisées (lck-IL-7 Tg versus E $\alpha$ -IL-7 Tg) peuvent en partie expliquer les résultats obtenus à priori contradictoires et notamment si l'IL-7 est exprimé dans des compartiments spécifiques en fonction du promoteur qui contrôle sa synthèse. Cependant, nous pensons que l'IL-7 n'agit plus au delà du stade DN2-3. C'est pourquoi, *in vitro* et *in vivo*, IL-7 a un effet bénéfique sur les DN1-DN2 (survie et prolifération) mais au delà de ces stades, l'IL-7 n'influence plus la thymopoïèse et peut même au contraire la freiner lorsque la cytokine est présente en excès (El Kassar, Lucas et al. 2004; Balciunaite, Ceredig et al. 2005). De même, *in vivo*, lorsque l'IL-7 est exprimée de manière ectopique par greffe intra-thymique de cellules stromales surexprimant l'IL-7, il n'a pas non plus d'effet au delà du stade DN3 et pas d'augmentation du passage DN→DP (Phillips, Brondstetter et al. 2004). Un ou des autres facteurs pourraient prendre le relais et contrôler la thymopoïèse au delà du stade DN3 en influençant la survie et la prolifération des thymocytes en cours de différenciation. Des expériences complémentaires sont envisageables pour déterminer la nature de ces facteurs. Notch semble être un bon candidat et notamment parce que l'interaction du récepteur Notch porté par les DN3 avec son ligand Delta-1 exprimé par les cellules stromales entretient le métabolisme et la survie des DN3 (Ciofani and Zuniga-Pflucker 2005). On peut aussi mettre en avant le rôle des signaux délivrés par le pré-TCR exprimé au stade DN3 et surtout sa fonction dans la survie des thymocytes en maturation via l'expression du gène anti-apoptotique BCL2A1 (Mandal, Borowski et al. 2005).





**Figure 3.1 :** Activité de prolifération (A), niveau d'expression de l'IL-7R (B) et de Bcl-2 (C) au cours de la thymopoïèse : une synthèse.

Bien que le thymus puisse produire des LyT tout au long de la vie adulte, le vieillissement entraîne une réduction de la cellularité et des capacités fonctionnelles de cet organe, on parle d'involution thymique. Chez la souris, ce déclin graduel de la taille du thymus débute vers 6 semaines et s'accompagne principalement de modifications de l'architecture thymique, d'une baisse de la génération de LyT naïfs exportés en périphérie et il s'en suit une réduction de la taille du répertoire TCR (pour revue Aspinall 2000; Aspinall and Andrew 2000; Aspinall 2003). Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer cette involution thymique. D'abord, les défauts intrinsèques des progéniteurs ont été mis en avant et testés. Ils sont moins nombreux à coloniser le thymus avec l'âge et leur efficacité à générer des LyT est moins importante (Thoman 1997; Adkins, Charyulu et al. 2000). Cependant les défauts extrinsèques semblent être dominants dans le phénomène d'involution thymique. On a surtout observé une modification du stroma thymique qui supportait moins bien la thymopoïèse (Aspinall and Andrew 2000; Aspinall, Andrew et al. 2002). Ainsi des expériences de greffe de moelle osseuse issue de jeunes souris chez des souris âgées irradiées ne permettent pas de restaurer une thymopoïèse optimale et un accroissement de la taille du thymus (Hirokawa, Utsuyama et al. 1994). Cette perte d'activité du thymus a principalement été expliquée par une réduction de la production d'hormones stéroïdes ou encore de l'IL-7. Ceci constitue deux pistes intéressantes pour « rajeunir le système immunitaire », et continuer à produire des cellules T naïves en nombre important tout au long de la vie ou au cours de pathologies ciblant les LyT.

A partir de l'étude des effets de la castration chimique ou chirurgicale sur la thymopoïèse, le rôle des hormones stéroïdes dans la thymopoïèse a été validé. En absence de ces hormones, très rapidement (sous 5-10 jours) la thymopoïèse reprend une activité normale qui se traduit par une augmentation de la taille du thymus et de la production de LyT malgré l'âge (Heng, Goldberg et al. 2005; Sutherland, Goldberg et al. 2005). En ce qui concerne les effets bénéfiques de l'IL-7, ils sont plus discutables. En effet l'injection d'IL-7 entraîne une augmentation des LyT périphériques qui peut être associée à la prolifération homéostatique et pas forcément à la thymopoïèse. Les travaux du groupe de Marilyn Thoman montrent que la greffe de cellules produisant constitutivement de l'IL-7 au niveau du thymus ne permet pas de réduire le phénomène d'involution thymique associé au vieillissement (Phillips, Brondstetter et al. 2004). Les auteurs avancent que deux phénomènes sont responsables de la réduction de

la thymopoïèse, une réduction de la survie des DN1 et une réduction de la survie et de la prolifération des DN4. L'IL-7 agit sur le premier mais pas sur le second. L'analyse de souris IL-7 Tg à différents ages permettrait de déterminer plus en détails le rôle de l'IL-7 sur le vieillissement du système immunitaire de manière plus approfondie. En premier lieu, on pourrait s'intéresser à la thymopoïèse mais aussi à la lymphopoïèse B qui dans ces étapes précoces dépend de l'IL-7. Ensuite, comme on sait que le vieillissement s'accompagne d'une réduction de l'activité fonctionnelle des LyT et B (Linton and Dorshkind 2004), il serait important de déterminer si le système immunitaire est plus opérationnel dans un contexte où l'IL-7 est sur-exprimée.

Le rôle de l'IL-7 dans l'involution thymique a principalement été évoqué à partir du moment où on a observé que le vieillissement est accompagné d'une réduction importante du niveau de transcription de l'IL-7 au niveau du thymus (Andrew and Aspinall 2002). De manière similaire par PCR quantitative, nous avons observé que chez les souris sauvages, l'expression de l'ARNm de l'IL-7 est réduite dans la moelle osseuse, la rate ou encore le thymus avec l'age (résultats non publiés). Cependant, on ne peut pas affirmer si c'est le nombre de cellules productrices d'IL-7 qui diminue ou leur activité. Des expériences complémentaires de fractionnement cellulaire des compartiments thymiques sont envisageables pour répondre à cette question et apporter des informations sur les effets du vieillissement sur le thymus ou la régulation de l'expression de l'IL-7 qui est toujours assez mystérieuse. Il faut noter que les *knock-in* de l'IL-7 et de l'IL-7R $\alpha$  n'ont pas encore été réalisés. Dans le but d'étudier la régulation de l'expression de ces gènes, la génération de ces souris serait également un outil précieux.

## 2. IL-7 et homéostasie

### *Homéostasie des LyT conventionnels*

Jusqu'à présent les souris IL-7 Tg avait permis de démontrer l'importance de l'IL-7 dans le développement lymphoïde, tandis que son rôle sur le compartiment de lymphocytes périphériques était moins claire. Nous nous sommes donc attachés à étudier le rôle de l'IL-7 dans l'homéostasie des LyB et LyT matures (articles 2 et 3). Nous avons pu observer que les effets de l'IL-7 variaient en fonction de la cible cellulaire et de la concentration d'IL-7 disponible (ce qui correspond indirectement au niveau de reconstitution en lymphocytes). Après transferts adoptifs dans des hôtes lymphopéniques surexprimant l'IL-7, nous avons observé une perturbation importante de l'homéostasie des LyT. Nous avons corrélié ces données aux effets exercés par l'IL-7 sur les LyT. Nous avons montré que l'IL-7 favorisait assez rapidement la survie des LyT CD4<sup>+</sup> mais que les effets sur leur prolifération étaient plus modestes. Pour les LyT CD8<sup>+</sup>, l'IL-7 exerce un effet de prolifération beaucoup plus important que pour les LyT CD4<sup>+</sup>, mais elle exerce des effets de survie plus tardifs. Les LyB quant à eux, ne sont pas affectés par l'excès d'IL-7 disponible. Nos données sur les LyB sont cohérentes avec les conclusions des expériences de transferts adoptifs dans des souris IL-7<sup>-/-</sup> ou contrôles (Cabatingan, Schmidt et al. 2002).

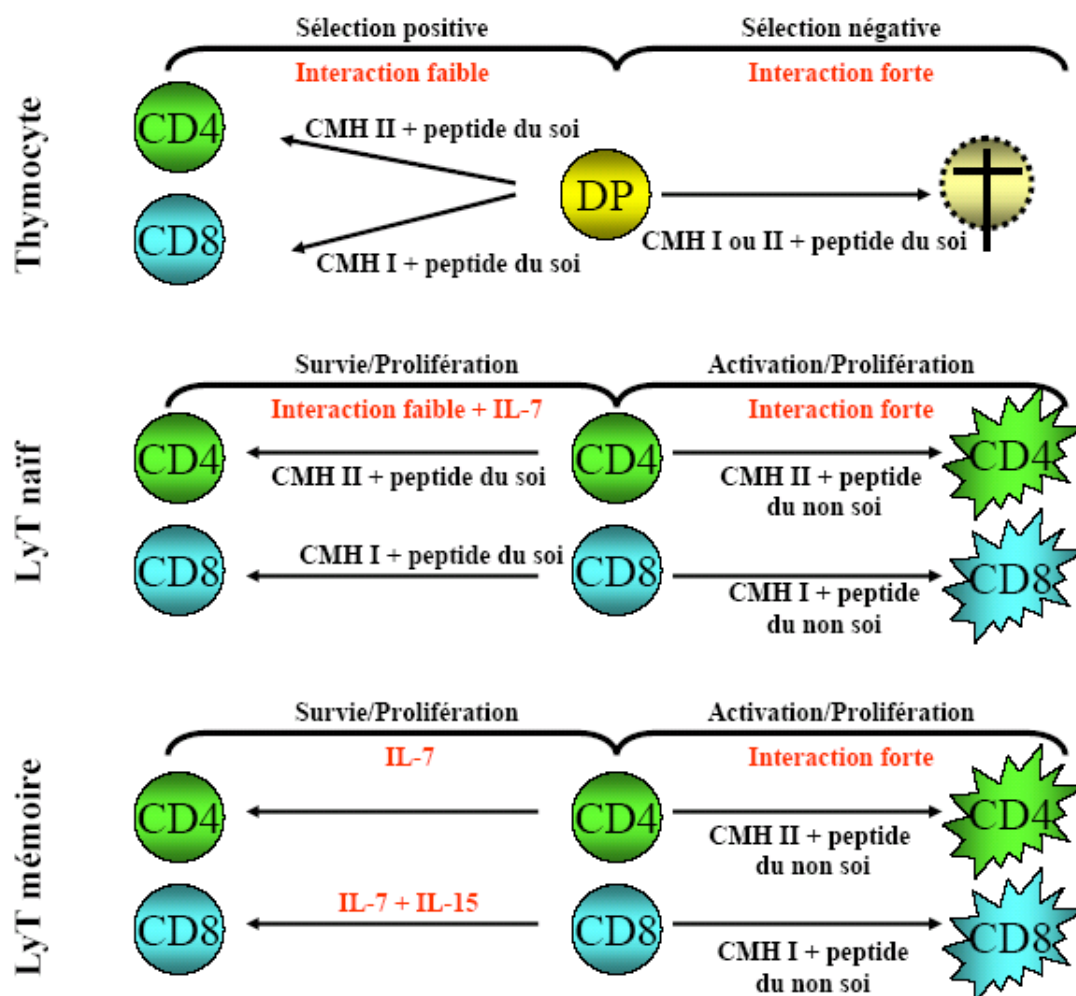
La différence de comportement entre les LyT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> vis à vis des signaux médiés par l'IL-7 reste encore mystérieuse. Néanmoins, elle a déjà été suggérée (Park, Yu et al. 2004) dans la littérature et est somme toute assez logique. De nombreux types cellulaires expriment l'IL-7R, et les signaux en aval de ce récepteur doivent être spécifiques en fonction du type cellulaire concerné pour assurer des fonctions biologiques adéquates. Ainsi par exemple, on peut dire que les cellules DN ou DP sont confrontées à la nécessité de poursuivre leur différenciation tandis que les LyT périphériques CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> cherchent à survivre et dans les deux cas des signaux IL-7-dépendants sont requis. On peut donc entrevoir que ces signaux mettent en jeu des voies de transduction différentes. Ces voies commencent à être décrites (Cf Chapitre 1). Il sera assez intéressant à l'avenir de mieux caractériser les éléments intracellulaires qui contrôlent la réponse à l'IL-7 en fonction du type cellulaire. Chacune des molécules en aval de l'IL-7R constituerait une cible pharmacologique potentielle pour limiter une réponse immune, un syndrome lympho-prolifératif ou au contraire favoriser la reconstitution du système immunitaire après une greffe.

### *Homéostasie des LyT non conventionnels : Lymphocytes NK-T et LyT $\gamma\delta$*

Il y'a peu d'études à l'heure actuelle concernant les déterminants de la régulation homéostatique des compartiments de lymphocytes NK-T et LyT $\gamma\delta$ . Le faible nombre de cellules qui compose ces compartiments de LyT et la diversité de localisation de ces lymphocytes dits non-conventionnels en sont sûrement la cause.

Les LyT $\gamma\delta$  sont IL-7R $\alpha^+$  et logiquement, on a montré que l'IL-7 (mais aussi l'IL-15) favorise la PIL des LyT $\gamma\delta$  (Baccala, Witherden et al. 2005). Ceux-ci subissent également une conversion phénotypique associée à leur prolifération. Il semblerait même que les LyT $\alpha\beta$  et LyT $\gamma\delta$  entrent en compétition pour l'IL-7. Ainsi, la présence de LyT $\alpha\beta$  dans des souris TCR $\delta^-$  (dépourvues de LyT $\gamma\delta$ ) est suffisante pour abroger la PIL des LyT $\gamma\delta$ . La PIL des LyT $\gamma\delta$  a lieu dans des souris CMH I $^-$  ou II $^-$  suggérant que les interactions TCR $\gamma\delta$ /CMH ne sont pas requises contrairement aux LyT $\alpha\beta$  CD4 $^+$  ou CD8 $^+$  conventionnels. Néanmoins, les LyT $\gamma\delta$  ne prolifèrent pas chez des souris TCR $\alpha^-$  (absence de LyT $\alpha\beta$ , présence de LyT $\gamma\delta$ ) malgré la présence en excès de l'IL-7 et IL-15. Il existe donc probablement des niches en nombre fini déjà occupées par les LyT $\gamma\delta$  endogènes. Ces niches pourraient contenir des facteurs/ressources spécifiques ou encore des sources d'interactions capitales pour maintenir le pool de LyT $\gamma\delta$  déjà en place. Il faut noter qu'il existe différentes sous-populations de LyT $\gamma\delta$  avec des localisations particulières en fonction de la chaîne V $\gamma$  exprimée (pour revue Hayday and Tigelaar 2003). Les LyT V $\gamma$ 1 $^+$  et V $\gamma$ 2 $^+$  sont prédominants dans les organes lymphoïdes. On retrouve les LyT V $\gamma$ 3 $^+$  dans la peau, V $\gamma$ 4 $^+$  dans les muqueuses et la langue, enfin les V $\gamma$ 5 $^+$  sont surtout présents dans les intestins. Il serait donc assez logique qu'en fonction des tissus, certaines interactions spécifiques entretiennent la survie et la prolifération des LyT $\gamma\delta$  dans leurs niches respectives. Le fait que les LyT $\alpha\beta$  possède un avantage compétitif sur les LyT $\gamma\delta$  lors de transfert adoptif soulève la question suivante : pourquoi y'a t'il toujours des LyT $\gamma\delta$  dans les organes lymphoïdes ? On peut émettre l'hypothèse que ces cellules sont générées plus tôt que les LyT $\alpha\beta$  au cours de l'ontogénie, ainsi elles sont capables de profiter temporairement de l'absence des LyT $\alpha\beta$  et des excès de IL-7 pour s'implanter au cours de la période néonatale.

En ce qui concerne les NK-T, il semblerait que l'IL-7 est moins importante que l'IL-15 pour leur expansion homéostatique, et étrangement les interaction TCR/CMH en l'occurrence ici via les molécules CD1d ne sont pas requises (Matsuda, Gapin et al. 2002). La faible proportion de NK-T au sein des LyT et leur localisation quelquefois particulière dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes (comme le foie) rend leur études plus difficiles mais suggère encore une fois que des signaux plus spécifiques contrôlent leur survie et leur prolifération. C'est un axe d'étude à développer.



**Figure 3.2 :** Sélection centrale Vs « sélection périphérique », même but mais des moyens différents.

### *La sélection centrale et périphérique : le parallèle.*

Les LyT exportés du thymus vers la périphérie constitue l'ensemble des cellules circulantes portant un panel de TCR aussi large que possible pour reconnaître les Ag du non-soi couplés aux molécules du CMH. Au niveau du thymus les étapes de sélection centrale ont permis sur la base de l'avidité des interactions offertes aux thymocytes en cours de développement de survivre à la condition de ne pas ou très peu reconnaître le soi. En périphérie la survie de ces LyT est encore une fois dépendante entre-autre des ces mêmes interactions, mais aussi de signaux supplémentaires assurant leur survie et la prolifération (Cf figure 3.2). Cependant, certaines cellules avec un fitness plus important (parce qu'elles sont plus aptes à reconnaître ces signaux) pourraient prendre l'avantage sur une population large (polyclonale) et composer une population moins variée mais majoritaire (oligoclonale). On parle du paradoxe compétition/diversité (pour revue De Boer and Perelson 1994; Freitas and Rocha 2000). Ceci entraînerait des trous dans le répertoire et serait néfaste à un individu, étant donnée que sa capacité à répondre aux Ag du non-soi de l'environnement se verrait théoriquement réduite. L'expression constitutive de l'IL-7R $\alpha$  par les LyT mémoire participerait à ce phénomène et favoriserait l'expansion exclusive de ces LyT dans un environnement où cette ressource est limitée. Il y'a une certaine logique de type «écologique» à ce phénomène. Cependant contrairement à ce qui se passe dans les écosystèmes où les prédateurs les plus adaptés survivent plus longtemps, ce phénomène n'est pas très fréquent dans le système immunitaire. En ce qui nous concerne, nous n'avons pas observé de modifications du répertoires des LyT après transferts adoptifs. On peut donc imaginer qu'il existe un mécanisme qui contre-balance le paradoxe compétition/diversité. Les travaux du laboratoire d'Alfred Singer ont mis en évidence une boucle de régulation du niveau d'expression de l'IL-7R sur les LyT en fonction du niveau d'expression des cytokines  $\gamma$ c-dépendantes et notamment de l'IL-7 elle-même (Park, Yu et al. 2004). La stimulation des LyT par l'IL-7 via leur récepteur entraîne une répression de la transcription de l'IL-7R $\alpha$ , elle assure une réponse limitée dans le temps à la stimulation par les cytokines et cela permet ainsi aux autres LyT de partager l'IL-7 encore disponible. Cette boucle de régulation met en jeu des FT différents entre les LyT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et pourrait expliquer la différence de fitness entre les LyT CD8<sup>+</sup> qui prolifèrent plus que les LyT CD4<sup>+</sup>. Dans ces travaux, la voie en aval de l'IL-7R dans les LyT CD8<sup>+</sup> est encore à identifier, nous imaginons que SOCS1 et 3

(Suppressor Of Cytokine Signaling) pourraient être de bons candidats. Ces FT viennent d'être décrits comme des répresseurs de la transcription en aval des récepteurs  $\gamma\text{c}$ -dépendants et ils sont exprimés dans le thymus (Starr and Hilton 1998; Rakesh and Agrawal 2005). En revanche, pour les LyT  $\text{CD4}^+$ , elle fait intervenir le facteur répresseur de transcription GFI1 (Growth Factor Independence) (Moroy 2005). Ces mêmes FT pourraient potentiellement jouer un rôle dans la thymopoïèse, et contrôler le passage du stade  $\text{DN} \rightarrow \text{DP}$  ou encore DP intermédiaire  $\text{CD4}^+\text{CD8}^{\text{low}} \rightarrow \text{CD4}^-\text{CD8}^+$ , en assurant l'extinction ou la reprise de l'expression de l'IL-7R respectivement. C'est une hypothèse qui reste encore à tester.

L'importance de la boucle de régulation IL-7-dépendante de l'expression de l'IL-7R $\alpha$  est à nuancer. En ce qui nous concerne dans une situation où l'IL-7 est exprimée de manière constitutive, nous n'avons pas observé de diminution du niveau de l'IL-7R $\alpha$  sur les LyT qui présentent un niveau d'expression comparable à celui des souris contrôles. De plus, malgré l'expansion importante des LyT mémoires, l'étude du répertoire des souris IL-7 Tg n'a pas révélée d'expansion oligoclonale (résultats non publiés et Kieper, Tan et al. 2002). On peut mettre en avant l'hypothèse que l'IL-7 est suffisante pour l'ensemble des LyT et qu'elle participe à la différenciation massive des LyT naïfs en LyT mémoires. Des études fonctionnelles des LyT pourraient être réalisées pour valider cette hypothèse.

#### « Des souris et ...les hommes ? »

A partir des résultats obtenus sur des modèles expérimentaux murins, l'importance de l'IL-7 dans le contrôle de l'homéostasie de LyT est maintenant indéniable. Cependant, ses effets sur les populations de LyT humains restent à clarifier et particulièrement si l'on envisage de recourir à des traitements favorisant la reconstitution des compartiments de LyT par injection de cytokine. La reconstitution de souris  $\text{Rag}^{-/-}.\gamma\text{c}^{-/-}$  avec des LyT humains constitue un résultat prometteur qui laisse envisager l'utilisation de ce modèle murin pour étudier la régulation homéostatique des LyT humains (Traggiai, Chicha et al. 2004). L'IL-7 murine n'a pas d'effets sur les LyT humains, par contre l'IL-7 humaine (hIL-7) exerce ses effets sur les LyT murins. Les effets de l'hIL-7 pourraient être testés par injections ou expression transgénique de l'hIL-7 dans les souris  $\text{Rag}^{-/-}.\gamma\text{c}^{-/-}$ . *In vitro*, il existe déjà quelques éléments qui permettent de penser que l'hIL-7 est importante en favorisant la survie et la prolifération des LyT humains (Geginat, Sallusto et al. 2001; Geginat, Campagnaro et al.



2002; Gett, Sallusto et al. 2003). De plus, on a montré que chez les patients séropositifs la reprise de l'activité de lymphopoïèse T est associée à une augmentation de la concentration de l'hIL-7 dans le sérum des malades (Napolitano, Grant et al. 2001).

Les souris Rag<sup>-/-</sup>.γc<sup>-/-</sup>.hIL-7 Tg constitueraient un bon modèle pour différentes approches de recherches appliquées. Entre-autre, après reconstitution ou greffe de moelle osseuse, ces souris permettraient de caractériser le rôle de l'hIL-7 dans l'efficacité des greffes de moelle osseuse ou dans le développement de lymphomes B humains (existant chez les souris IL-7 Tg, Fisher, Burdet et al. 1993; Fisher, Burdet et al. 1995) ou encore de disséquer le rôle de l'hIL-7 sur les LyT humains *in vivo* au cours de la prolifération homéostatique ou d'une réponse immune. Par ailleurs, cette lignée murine présenterait l'avantage d'être contaminable par le VIH ou des souches virales atténuées pour tester les effets de l'IL-7 sur l'infection ou encore la lymphopénie induite au cours du SIDA.

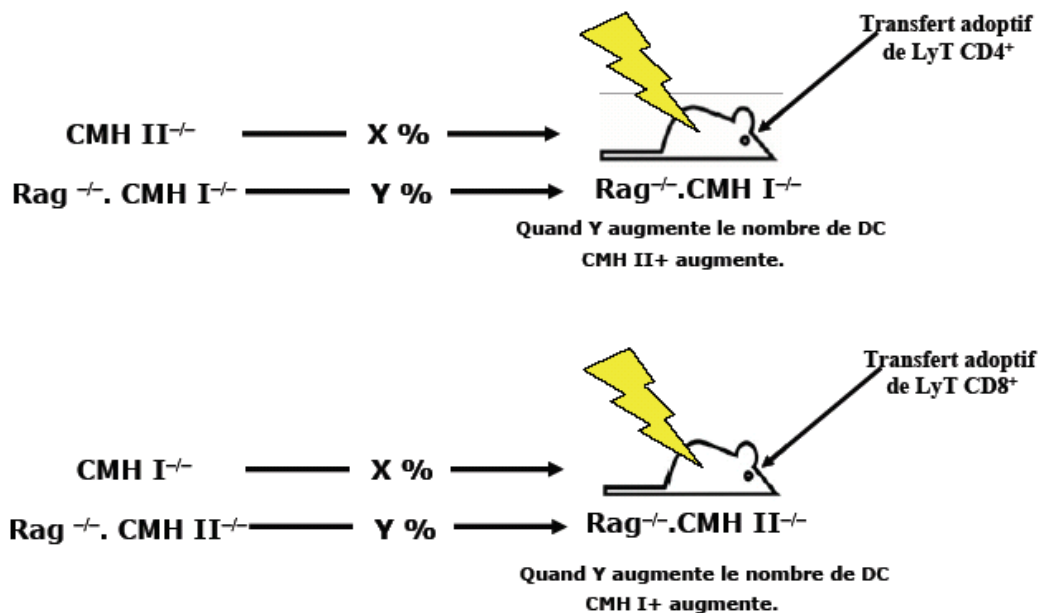
#### *Encore des questions ouvertes...*

##### ◆ Où a lieu la PIL ?

Une des critiques majeures que l'on peut faire à nos travaux et la majorité des travaux sur l'homéostasie des lymphocytes, c'est d'étudier une population dynamique avec une vision statique du système immunitaire et une méthodologie simple. Les lymphocytes ne sont pas uniquement localisés dans les organes lymphoïdes et pourtant c'est surtout à partir des prélèvements de ces organes et de l'étude des lymphocytes qui les composent que les conclusions qui valent à l'heure actuelle sont tirées. Aussi, rien ne prouve que le ou les signaux déclenchant la prolifération homéostatique soient délivrés par les organes lymphoïdes. On ne sait pas non plus si ces signaux doivent être délivrés de manière ponctuelle ou continue pour soutenir la PIL. Cependant, on sait que lorsque les LyT sont traités à la toxine de *pertussis* avant leur transfert adoptif, leurs propriétés de migration sont inhibées et les LyT ne sont plus capables de faire de la PIL. Lorsque les transferts adoptifs sont effectués dans des souris LTα<sup>-/-</sup> (défaut d'organisation des zones lymphoïdes T), ou encore dans des souris *aly/aly* splénectomisées (absence d'organes lymphoïdes secondaires) encore une fois les LyT ne sont plus ou très peu capables de faire de la PIL (Dai and Lakkis 2001; Dummer,

Ernst et al. 2001). Ceci suggèrent que l'entrée dans les organes lymphoïdes et plus particulièrement les zones T est un pré-requis pour déclencher la prolifération homéostatique des LyT. Néanmoins, ceci ne permet pas d'affirmer si cette localisation supporte réellement la PIL ou si elle apporte seulement temporairement des signaux intégrés par les lymphocytes qui peuvent ensuite proliférer ailleurs. Nos résultats ainsi que ceux d'autres groupes semblent suggérer que la PIL peut avoir lieu en dehors des organes lymphoïdes secondaires (Agenes and Freitas 1999; Becker, Coley et al. 2005; Bosco, Agenes et al. 2005). Après transfert adoptif, on retrouve dans le sang, le thymus ou encore la moelle osseuse des LyT CFSE<sup>low</sup> avec un cinétique de dilution du CFSE comparable aux LyT de la rate ou des ganglions lymphatiques (résultats non publiés).

La possibilité de fournir des interactions TCR/CMH ou des cytokines de manière restreinte dans un organe donné ou limitée dans un organe donné, permettrait de déterminer clairement si la localisation de la PIL dans les zones T est importante ou si elle est seulement dû indirectement au fait que dans les zones T des organes lymphoïdes il y'a un regroupement des signaux nécessaires à la PIL. Dans ces zones T, il y'a des DC qui possèdent à priori la batterie des signaux nécessaires à déclencher et entretenir la PIL (Dummer, Ernst et al. 2001; Ge, Palliser et al. 2002; Gruber and Brocker 2005). Malgré que les DC soient capables de fournir les interactions CMH aux TCR des LyT ou encore de produire des cytokines importantes pour la PIL, le rôle de ces cellules est à clarifier. D'après les données de la littérature, les DC constitueraient une plate-forme d'intégration de l'espace et des ressources disponibles pour laquelle les LyT sont en compétition. C'est assez difficile à concevoir. D'abord parce que la morphologie des DC et leur capacité migratoire permet à ces cellules de contacter beaucoup de LyT en même temps. Enfin, même en faible nombre, les DC sont capables de monter une réponse immune faisant intervenir des milliers de LyT. Ces données n'autorisent pas réellement à penser que ces cellules constituent une plate-forme saturable. Une manière de tester rigoureusement cette hypothèse, serait de réaliser des chimères mixtes compétitives où les DC ne seraient présentes que dans les organes lymphoïdes (issus des précurseurs hématopoïétiques greffés) et leur nombre serait plus ou moins limité (Cf figure 3.3). Ces souris serviraient alors pour des expériences de transfert adoptifs de LyT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>.



**Figure 3.3 :** Proposition expérimentale pour tester l'importance des DC, leur localisation et leur nombre dans la prolifération homéostatique des LyT.

♦ Mode d'action de l'IL-7 : Bio-disponibilité ou concentration disponible, effet chemokine ?

De nombreux types cellulaires et par conséquent de nombreux tissus sont capables de produire l'IL-7 (Cf Chapitre 1). Aussi, hormis la quantité d'IL-7 disponible pour réguler l'homéostasie des LyT en condition physiologique (hypothèse que nous avons testé dans l'article 2), on peut imaginer que c'est la bio-disponibilité de l'IL-7 qui est importante dans les différents tissus de l'organisme. Les LyT sont amenés à migrer par le sang ou la lymphe avant de rejoindre les tissus périphériques ou lymphoïdes. Des travaux récents ont montré que l'IL-7 pouvait être associée aux macromolécules de la matrice extracellulaire comme l'héparane sulfate (Clarke, Katoh et al. 1995; Banwell, Partington et al. 2000). On retrouve aussi de l'IL-7 associée à l'héparine avec une très grande affinité (Kimura, Matsubara et al.

1991). L'héparine est présente dans le sérum mais aussi dans certains tissus, elle peut jouer le rôle de protéine régulatrice de l'activité de l'IL-7. En effet, elle pourrait transporter l'IL-7 sur différents sites en la protégeant de la dégradation par certaine protéase, ou encore en complexant l'IL-7 elle pourrait concentrer son action au niveau de certain tissus ou au contraire limiter son action en bloquant son interaction avec certaines cellules IL-7R $\alpha^+$ . La relevance de ces mécanismes a été prouvée *in vitro* (Borghesi, Yamashita et al. 1999). L'addition d'héparine dans des cultures de lignées de LyB immatures sur des cellules stromales produisant de l'IL-7 bloque la différenciation IL-7-dépendante des LyB immatures en LyB.

Dans la famille des interleukines, seules l'IL-8 (CXCL8) appartient à aussi à la famille des chémokines (pour revue Baggiolini, Loetscher et al. 1995), elle a la capacité de mobiliser certains types cellulaires (les polynucléaires neutrophiles, CXCR1/2 $^+$ ). Les LyT effecteurs et mémoires présentent des profils de distribution tissulaire particulier on les retrouvera plus souvent dans les tissus périphériques et surtout ceux où une réponse immune spécifique a été élaborée. On explique cela par l'expression de molécules d'adhésion ou d'attraction particulières sur les vaisseaux et sites inflammatoires, et les récepteurs adéquates sur les LyT. Comme l'IL-7 est importante pour la survie et la prolifération des LyT, on peut imaginer que les LyT sont capables de sonder l'IL-7 disponible et modifier leur comportement migratoire en conséquence. On peut aussi imaginer que les tissus inflammatoires peuvent stimuler la production ou favoriser la bio-disponibilité de l'IL-7 pour les LyT activés. Bien entendu ces hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives. La différenciation des LyT naïfs vers les LyT effecteurs ou mémoires s'accompagne de la modification de leur phénotype et notamment l'induction de l'expression de molécule d'adhésion (CD44, LFA-1, Ly6c, ... ). L'influence de l'IL-7 sur l'expression de ces molécules pourrait constituer une preuve même indirecte de ses effets sur les propriétés adhésives/migratoires des LyT, pour leur mobilisation dans les sites inflammatoires mais surtout dans les foyers importants pour la PIL comme les zones peri-artériolaires lymphocytaires des follicules spléniques (article 2). D'autre part des expériences où la concentration tissu spécifique de l'IL-7 pourrait être manipulée seraient intéressantes à envisager dans le cadre de cette question.

### 3. Homéostasie et tolérance

La taille du compartiment lymphocytaire T est relativement constante. Ceci est dû principalement à des mécanismes de compensation périphérique comme la régulation de la survie ou de la prolifération des LyT (Cf chapitre 1). Malheureusement, il existe une association de plus en plus claire entre la lymphopénie, la compensation de cet état par la PIL et le développement de pathologies auto-immunes. Il a été montré que la PIL pouvait accélérer le développement de pathologies auto-immunes en favorisant de manière déséquilibrée, l'expansion des clones de LyT autoréactifs (pour revue Baccala and Theofilopoulos 2005).

Les Treg assurent principalement la tolérance en périphérie (pour revue Sakaguchi 2002). Néanmoins l'activité de ces cellules n'est pas très claire et quelque fois pas suffisante. Après déplétion *in vivo* des Treg dans des souris contrôles, on n'observe pas l'apparition de pathologies auto-immunes à court terme. Par contre, le transfert de LyT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> dans des souris Rag<sup>-/-</sup> ou CD3<sup>-/-</sup> provoque l'apparition de pathologies auto-immunes intestinales de Bowel alors que le cotransfert de LyT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> avec des Treg n'est pas pathogène (Annacker, Pimenta-Araujo et al. 2001). Ces résultats suggèrent que l'état lymphopénique et la PIL qui anime les LyT résiduels fourniraient un signal qui déclenche les pathologies auto-immunes. Le diabète auto-immun de type 1 est un bon exemple pour illustrer ce phénomène. Dans les souris NOD qui présente une lymphopénie T, la susceptibilité au diabète est réduite après reconstitution du compartiment de LyT par transfert adoptif ou encore après une immunisation avec de l'adjuvant de Freund. A l'inverse, une lymphopénie plus exagérée chez les souris NOD consécutive à une thymectomie ou une destruction pharmacologique des LyT provoque une déclaration plus rapide et une incidence plus importante des diabètes (pour revue Anderson and Bluestone 2005). King C. et al. ont montré que dans des fonds génétiques qui favorisent le développement de pathologies auto-immunes, la lymphopénie permet l'expansion de clone de LyT effecteurs délétères via l'excès d'IL-21 dans le milieu (King, Ilic et al. 2004). D'autres pathologies comme le lupus, l'arthrite rhumatoïde ou encore le syndrome de Sjögren mettraient en jeu le même principe (pour revue Marleau and Sarvetnick 2005). Dans ces pathologies, on observe souvent une conversion phénotypique des LyT naïfs en LyT mémoires-activés, avec un répertoire plus restreint des LyT.

Nous imaginons que l'état lymphopénique fournit une fenêtre ou une opportunité d'expansion aux LyT autoréactifs périphériques qui en temps normal cohabitent avec les LyT normaux et sont inhibés par les Treg. Cependant le développement de pathologies auto-immunes est souvent associés à des fonds génétiques particuliers. On constate rarement cela dans des souris contrôles sauvages ou même des souris lymphopéniques sauvages. Nous avons cherché à expliquer ce phénomène en imaginant que les Treg pouvaient être impliqués. Nous avons montré que les souris  $pT\alpha^{-/-}$  présentaient une lymphopénie T importante mais sans conséquences néfastes. L'étude du compartiment de LyT périphériques des souris  $pT\alpha^{-/-}$  a révélé une augmentation relative importante de la population de Treg. C'est pourquoi, nous avons imaginé que la génération de cellules Treg en périphérie pouvait être conditionnée par la PIL et avoir un rôle physiologique. En réalisant des chimère de moelle osseuse nous permettant de titrer la génération de LyT en périphérie, nous avons effectivement montré que moins il y'a de LyT en périphérie plus la population de Treg est importante. Il est donc assez séduisant de penser qu'il existe un mécanisme physiologique qui limite la rupture de la tolérance au soi induite par la lymphopénie et la PIL en favorisant le génération périphérique de Treg. Cependant, il nous reste maintenant à déterminer le mode de génération des Treg en périphérie. Certains rapports font état du rôle de l'IL-2 produite par les LyT activés ou qui font de la PIL pour entraîner la différenciation et la survie des  $CD4^{+}CD25^{-}$  en Treg (Bayer, Yu et al. 2005; Setoguchi, Hori et al. 2005). C'est une piste que nous souhaiterions étudier prochainement.

Lorsque le compartiment de LyT n'est pas restauré, il y'a donc une perturbation notable de la distribution de LyT périphérique. La PIL entraîne une génération de LyT mémoire-activé par différenciation des LyT. On observe le même phénomène avec les LyB. En situations lymphopéniques, l'essentiel des LyB ont un phénotype de type MZB (ou LyB activé). Au fur et à mesure que le compartiment de FB (ou LyB naïf) est restauré, la proportion de MZB est réduite (manuscrit soumis et Agnes 2003). A partir de ces résultats, nous proposons qu'il existe un principe du genre « less but the best », pour assurer une première ligne de défense la plus efficace possible et même si le système immunitaire perd en spécificité dans une situation de lymphopénie chronique. Néanmoins les propriétés fonctionnelles *in vivo* des LyB et LyT générés dans ces conditions n'ont jusque là pas encore été testées rigoureusement. D'après notre étude, les LyT des souris lymphopéniques  $pT\alpha^{-/-}$  sont capables de faire une réponse T-dépendante similaire aux souris contrôles. D'autres types

de réponses immunes pourraient être testées pour affirmer catégoriquement qu'une adaptation du système immunitaire du type « less but the best » existe et jusqu'à quelle mesure elle est efficace.





# Références bibliographiques

## A

- Adkins, B., V. Charyulu, et al. (2000). "Early block in maturation is associated with thymic involution in mammary tumor-bearing mice." *J Immunol* **164**(11): 5635-40.
- Agnes, F. (2003). "B lymphocyte life span, rate of division and differentiation are regulated by total cell number." *Eur J Immunol* **33**(4): 1063-9.
- Agnes, F., N. Bosco, et al. (2005). "Differential expression of regulator of G-protein signalling transcripts and in vivo migration of CD4+ naive and regulatory T cells." *Immunology* **115**(2): 179-88.
- Agnes, F. and A. A. Freitas (1999). "Transfer of small resting B cells into immunodeficient hosts results in the selection of a self-renewing activated B cell population." *J Exp Med* **189**(2): 319-30.
- Alam, S. M., I. N. Crispe, et al. (1995). "Allelic exclusion of mouse T cell receptor alpha chains occurs at the time of thymocyte TCR up-regulation." *Immunity* **3**(4): 449-58.
- Aldrich, C. J., H. G. Ljunggren, et al. (1994). "Positive selection of self- and alloreactive CD8+ T cells in Tap-1 mutant mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(14): 6525-8.
- Allman, D., R. C. Lindsley, et al. (2001). "Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation." *J Immunol* **167**(12): 6834-40.
- Allman, D. and J. P. Miller (2003). "Common lymphoid progenitors, early B-lineage precursors, and IL-7: characterizing the trophic and instructive signals underlying early B cell development." *Immunol Res* **27**(2-3): 131-40.
- Allman, D., B. Srivastava, et al. (2004). "Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells." *Immunol Rev* **197**: 147-60.
- Almeida, A. R., J. A. Borghans, et al. (2001). "T cell homeostasis: thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors." *J Exp Med* **194**(5): 591-9.
- Almeida, A. R., N. Legrand, et al. (2002). "Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers." *J Immunol* **169**(9): 4850-60.
- Anderson, G. and E. J. Jenkinson (2001). "Lymphostromal interactions in thymic development and function." *Nat Rev Immunol* **1**(1): 31-40.
- Anderson, M. S. and J. A. Bluestone (2005). "The NOD mouse: a model of immune dysregulation." *Annu Rev Immunol* **23**: 447-85.
- Andersson, J., A. Boasso, et al. (2005). "The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients." *J Immunol* **174**(6): 3143-7.
- Andrew, D. and R. Aspinall (2002). "Age-associated thymic atrophy is linked to a decline in IL-7 production." *Exp Gerontol* **37**(2-3): 455-63.
- Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, et al. (2001). "CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10." *J Immunol* **166**(5): 3008-18.
- Apostolou, I., A. Sarukhan, et al. (2002). "Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen." *Nat Immunol* **3**(8): 756-63.
- Ariizumi, K., Y. Meng, et al. (1995). "IFN-gamma-dependent IL-7 gene regulation in keratinocytes." *J Immunol* **154**(11): 6031-9.
- Aspinall, R. (2000). "Longevity and the immune response." *Biogerontology* **1**(3): 273-8.
- Aspinall, R. (2003). "Age-related changes in the function of T cells." *Microsc Res Tech* **62**(6): 508-13.
- Aspinall, R. and D. Andrew (2000). "Thymic involution in aging." *J Clin Immunol* **20**(4): 250-6.
- Aspinall, R., D. Andrew, et al. (2002). "Age-associated changes in thymopoiesis." *Springer Semin Immunopathol* **24**(1): 87-101.
- Asquith, B., C. Debacq, et al. (2002). "Lymphocyte kinetics: the interpretation of labelling data." *Trends Immunol* **23**(12): 596-601.

## B

- Baccala, R. and A. N. Theofilopoulos (2005). "The new paradigm of T-cell homeostatic proliferation-induced autoimmunity." *Trends Immunol* **26**(1): 5-8.
- Baccala, R., D. Witherden, et al. (2005). "Gamma delta T cell homeostasis is controlled by IL-7 and IL-15 together with subset-specific factors." *J Immunol* **174**(8): 4606-12.
- Baggiolini, M., P. Loetscher, et al. (1995). "Interleukin-8 and the chemokine family." *Int J Immunopharmacol* **17**(2): 103-8.
- Bain, G. and C. Murre (1998). "The role of E-proteins in B- and T-lymphocyte development." *Semin Immunol* **10**(2): 143-53.
- Balciunaite, G., R. Ceredig, et al. (2005). "The role of Notch and IL-7 signaling in early thymocyte proliferation and differentiation." *Eur J Immunol* **35**(4): 1292-300.
- Balciunaite, G., R. Ceredig, et al. (2005). "A B220+ CD117+ CD19- hematopoietic progenitor with potent lymphoid and myeloid developmental potential." *Eur J Immunol* **35**(7): 2019-30.
- Balciunaite, G., R. Ceredig, et al. (2005). "The earliest subpopulation of mouse thymocytes contains potent T, significant macrophage, and natural killer cell but no B-lymphocyte potential." *Blood* **105**(5): 1930-6.
- Banwell, C. M., K. M. Partington, et al. (2000). "Studies on the role of IL-7 presentation by mesenchymal fibroblasts during early thymocyte development." *Eur J Immunol* **30**(8): 2125-9.
- Bayer, A. L., A. Yu, et al. (2005). "Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period." *J Exp Med* **201**(5): 769-77.
- Becker, T. C., S. M. Coley, et al. (2005). "Bone marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T cells." *J Immunol* **174**(3): 1269-73.

- Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, et al. (2002). "CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity." *Nature* **420**(6915): 502-7.
- Bellier, B., V. Thomas-Vaslin, et al. (2003). "Turning immunological memory into amnesia by depletion of dividing T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 15017-22.
- Berg, L. J., G. D. Frank, et al. (1990). "The effects of MHC gene dosage and allelic variation on T cell receptor selection." *Cell* **60**(6): 1043-53.
- Berg, L. J., A. M. Pullen, et al. (1989). "Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand." *Cell* **58**(6): 1035-46.
- Berzins, S. P., D. I. Godfrey, et al. (1999). "A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17): 9787-91.
- Bevan, M. J. (1977). "Cytotoxic t-cell response to histocompatibility antigens: the role of H-2." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **41 Pt 2**: 519-27.
- Bevan, M. J. (1977). "In a radiation chimera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells." *Nature* **269**(5627): 417-8.
- Borghesi, L. A., Y. Yamashita, et al. (1999). "Heparan sulfate proteoglycans mediate interleukin-7-dependent B lymphopoiesis." *Blood* **93**(1): 140-8.
- Bosco, N., F. Agenes, et al. (2005). "Effects of increasing IL-7 availability on lymphocytes during and after lymphopenia-induced proliferation." *J Immunol* **175**(1): 162-70.
- Boss, J. M. (1997). "Regulation of transcription of MHC class II genes." *Curr Opin Immunol* **9**(1): 107-13.
- Bosselut, R. (2004). "CD4/CD8-lineage differentiation in the thymus: from nuclear effectors to membrane signals." *Nat Rev Immunol* **4**(7): 529-40.
- Boursalian, T. E., J. Golob, et al. (2004). "Continued maturation of thymic emigrants in the periphery." *Nat Immunol* **5**(4): 418-25.
- Brocker, T. (1997). "Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells." *J Exp Med* **186**(8): 1223-32.
- Buer, J., I. Aifantis, et al. (1997). "Role of different T cell receptors in the development of pre-T cells." *J Exp Med* **185**(9): 1541-7.
- Buer, J., I. Aifantis, et al. (1997). "T-cell development in the absence of the pre-T-cell receptor." *Immunol Lett* **57**(1-3): 5-8.
- Carvalho, T. L., T. Mota-Santos, et al. (2001). "Arrested B lymphopoiesis and persistence of activated B cells in adult interleukin 7(-/-) mice." *J Exp Med* **194**(8): 1141-50.
- Casrouge, A., E. Beaudoin, et al. (2000). "Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes." *J Immunol* **164**(11): 5782-7.
- Ceredig, R. (1990). "Intrathymic proliferation of perinatal mouse alpha beta and gamma delta T cell receptor-expressing mature T cells." *Int Immunol* **2**(9): 859-67.
- Ceredig, R., J. Andersson, et al. (1999). "Effect of deregulated IL-7 transgene expression on B lymphocyte development in mice expressing mutated pre-B cell receptors." *Eur J Immunol* **29**(9): 2797-807.
- Ceredig, R. and H. R. MacDonald (1982). "Ontogeny of murine thymus cells: correlation of surface phenotype with the appearance of cytolytic T lymphocyte precursors." *Prog Clin Biol Res* **85 Pt A**: 443-9.
- Ceredig, R. and T. Rolink (2002). "A positive look at double-negative thymocytes." *Nat Rev Immunol* **2**(11): 888-97.
- Ciofani, M., T. M. Schmitt, et al. (2004). "Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation." *J Immunol* **172**(9): 5230-9.
- Ciofani, M. and J. C. Zuniga-Pflucker (2005). "Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism." *Nat Immunol* **6**(9): 881-8.
- Clarke, D., O. Katoh, et al. (1995). "Interaction of interleukin 7 (IL-7) with glycosaminoglycans and its biological relevance." *Cytokine* **7**(4): 325-30.
- Cosenza, L., G. Gorgun, et al. (2002). "Interleukin-7 receptor expression and activation in nonhaematopoietic neoplastic cell lines." *Cell Signal* **14**(4): 317-25.
- Cozzo, C., M. A. Lerman, et al. (2005). "Selection of CD4+CD25+ regulatory T cells by self-peptides." *Curr Top Microbiol Immunol* **293**: 3-23.
- Crispe, I. N., R. P. Shimonkevitz, et al. (1987). "Expression of T cell antigen receptor beta-chains on subsets of mouse thymocytes. Analysis by three-color flow cytometry." *J Immunol* **139**(11): 3585-9.
- Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." *Nat Med* **10**(9): 942-9.
- Curotto de Lafaille, M. A., A. C. Lino, et al. (2004). "CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion." *J Immunol* **173**(12): 7259-68.
- Dai, Z. and F. G. Lakkis (2001). "Cutting edge: Secondary lymphoid organs are essential for maintaining the CD4, but not CD8, naive T cell pool." *J Immunol* **167**(12): 6711-5.
- De Boer, R. J. and A. S. Perelson (1994). "T cell repertoires and competitive exclusion." *J Theor Biol* **169**(4): 375-90.
- DeKoter, R. P., H. J. Lee, et al. (2002). "PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors." *Immunity* **16**(2): 297-309.
- Denny, P., C. J. Lord, et al. (1997). "Mapping of the IDDM locus Idd3 to a 0.35-cM interval containing the interleukin-2 gene." *Diabetes* **46**(4): 695-700.
- Dudley, E. C., H. T. Petrie, et al. (1994). "T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice." *Immunity* **1**(2): 83-93.
- Dujardin, H. C., O. Buren-Defranoux, et al. (2004). "Regulatory potential and control of Foxp3 expression in newborn CD4+ T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(40): 14473-8.
- Dummer, W., B. Ernst, et al. (2001). "Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment." *J Immunol* **166**(4): 2460-8.

## C-D

- Cabatingan, M. S., M. R. Schmidt, et al. (2002). "Naive B lymphocytes undergo homeostatic proliferation in response to B cell deficit." *J Immunol* **169**(12): 6795-805.
- Call, M. E. and K. W. Wucherpfennig (2005). "The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function." *Annu Rev Immunol* **23**: 101-25.
- Cao, D., V. Malmstrom, et al. (2003). "Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis." *Eur J Immunol* **33**(1): 215-23.
- Capone, M., R. D. Hockett, Jr., et al. (1998). "Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12522-7.

## E-F

- El Kassar, N., P. J. Lucas, et al. (2004). "A dose effect of IL-7 on thymocyte development." *Blood* **104**(5): 1419-27.
- Erman, B., L. Feigenbaum, et al. (2002). "Early TCRalpha expression generates TCRalphagamma complexes that signal the DN-to-DP transition and impair development." *Nat Immunol* **3**(6): 564-9.
- Erman, B., T. I. Guinter, et al. (2004). "Defined alphabeta T cell receptors with distinct ligand specificities do not require those ligands to signal double negative thymocyte differentiation." *J Exp Med* **199**(12): 1719-24.
- Ernst, B., D. S. Lee, et al. (1999). "The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery." *Immunity* **11**(2): 173-81.
- Fehling, H. J., A. Krotkova, et al. (1995). "Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells." *Nature* **375**(6534): 795-8.
- Fehling, H. J. and H. von Boehmer (1997). "Early alpha beta T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice." *Curr Opin Immunol* **9**(2): 263-75.
- Fisher, A. G., C. Burdet, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders in IL-7 transgenic mice: expansion of immature B cells which retain macrophage potential." *Int Immunol* **7**(3): 415-23.
- Fisher, A. G., C. Burdet, et al. (1993). "Lymphoproliferative disorders in an IL-7 transgenic mouse line." *Leukemia* **7 Suppl 2**: S66-8.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-6.
- Freitas, A. A. and B. Rocha (2000). "Population biology of lymphocytes: the flight for survival." *Annu Rev Immunol* **18**: 83-111.
- Freitas, A. A., B. Rocha, et al. (1986). "Lymphocyte population kinetics in the mouse." *Immunol Rev* **91**: 5-37.
- Fry, T. J. and C. L. Mackall (2001). "Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis?" *Trends Immunol* **22**(10): 564-71.
- Fry, T. J. and C. L. Mackall (2002). "Interleukin-7: from bench to clinic." *Blood* **99**(11): 3892-904.
- Geginat, J., S. Campagnaro, et al. (2002). "TCR-independent proliferation and differentiation of human CD4+ T cell subsets induced by cytokines." *Adv Exp Med Biol* **512**: 107-12.
- Geginat, J., F. Sallusto, et al. (2001). "Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells." *J Exp Med* **194**(12): 1711-9.
- Germain, R. N. and M. K. Jenkins (2004). "In vivo antigen presentation." *Curr Opin Immunol* **16**(1): 120-5.
- Gett, A. V., F. Sallusto, et al. (2003). "T cell fitness determined by signal strength." *Nat Immunol* **4**(4): 355-60.
- Ghosh, P., M. Amaya, et al. (1995). "The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3." *Nature* **378**(6556): 457-62.
- Gill, J., M. Malin, et al. (2003). "Thymic generation and regeneration." *Immunol Rev* **195**: 28-50.
- Gleeson, P. A., B. H. Toh, et al. (1996). "Organ-specific autoimmunity induced by lymphopenia." *Immunol Rev* **149**: 97-125.
- Godfrey, D. I., J. Kennedy, et al. (1994). "Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation." *J Immunol* **152**(10): 4783-92.
- Godfrey, D. I., J. Kennedy, et al. (1993). "A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression." *J Immunol* **150**(10): 4244-52.
- Goldrath, A. W. and M. J. Bevan (1999). "Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts." *Immunity* **11**(2): 183-90.
- Goldrath, A. W., L. Y. Bogatzki, et al. (2000). "Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation." *J Exp Med* **192**(4): 557-64.
- Grabstein, K. H., T. J. Waldschmidt, et al. (1993). "Inhibition of murine B and T lymphopoiesis in vivo by an anti-interleukin 7 monoclonal antibody." *J Exp Med* **178**(1): 257-64.
- Graziano, M., Y. St-Pierre, et al. (1998). "The fate of thymocytes labeled in vivo with CFSE." *Exp Cell Res* **240**(1): 75-85.
- Grillet, N., A. Pattyn, et al. (2005). "Generation and characterization of Rgs4 mutant mice." *Mol Cell Biol* **25**(10): 4221-8.
- Gruber, A. and T. Brocker (2005). "MHC class I-positive dendritic cells (DC) control CD8 T cell homeostasis in vivo: T cell lymphopenia as a prerequisite for DC-mediated homeostatic proliferation of naive CD8 T cells." *J Immunol* **175**(1): 201-6.

## G

- Gabor, M. J., D. I. Godfrey, et al. (1997). "Recent thymic emigrants are distinct from most medullary thymocytes." *Eur J Immunol* **27**(8): 2010-5.
- Garcia, K. C. and E. J. Adams (2005). "How the T cell receptor sees antigen--a structural view." *Cell* **122**(3): 333-6.
- Garcia, K. C., L. Teyton, et al. (1999). "Structural basis of T cell recognition." *Annu Rev Immunol* **17**: 369-97.
- Ge, Q., H. Hu, et al. (2002). "Naive to memory T-cell differentiation during homeostasis-driven proliferation." *Microbes Infect* **4**(5): 555-8.
- Ge, Q., D. Palliser, et al. (2002). "Homeostatic T cell proliferation in a T cell-dendritic cell coculture system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2983-8.

## H-I

- Hare, K. J., E. J. Jenkinson, et al. (2000). "An essential role for the IL-7 receptor during intrathymic expansion of the positively selected neonatal T cell repertoire." *J Immunol* **165**(5): 2410-4.
- Havran, W. L., M. Poenie, et al. (1987). "Expression and function of the CD3-antigen receptor on murine CD4+8+ thymocytes." *Nature* **330**(6144): 170-3.
- Hayday, A. and R. Tigelaar (2003). "Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells." *Nat Rev Immunol* **3**(3): 233-42.

- Hazenbergh, M. D., M. C. Verschuren, et al. (2001). "T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation." *J Mol Med* **79**(11): 631-40.
- He, X., C. A. Janeway, Jr., et al. (2002). "Dual receptor T cells extend the immune repertoire for foreign antigens." *Nat Immunol* **3**(2): 127-34.
- Heath, W. R., G. T. Belz, et al. (2004). "Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens." *Immunol Rev* **199**: 9-26.
- Heng, T. S., G. L. Goldberg, et al. (2005). "Effects of castration on thymocyte development in two different models of thymic involution." *J Immunol* **175**(5): 2982-93.
- Hirokawa, K., M. Utsuyama, et al. (1994). "Understanding the mechanism of the age-change of thymic function to promote T cell differentiation." *Immunol Lett* **40**(3): 269-77.
- Hoffman, E. S., L. Passoni, et al. (1996). "Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo." *Genes Dev* **10**(8): 948-62.
- Hori, S., T. L. Carvalho, et al. (2002). "CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice." *Eur J Immunol* **32**(5): 1282-91.
- Hori, S., M. Haury, et al. (2002). "Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 8213-8.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* **299**(5609): 1057-61.
- Hori, S. and S. Sakaguchi (2004). "Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells." *Microbes Infect* **6**(8): 745-51.
- Hsieh, C. S., Y. Liang, et al. (2004). "Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors." *Immunity* **21**(2): 267-77.
- Iellem, A., M. Mariani, et al. (2001). "Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." *J Exp Med* **194**(6): 847-53.
- Irving, B. A., F. W. Alt, et al. (1998). "Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains." *Science* **280**(5365): 905-8.
- Itoh, M., T. Takahashi, et al. (1999). "Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance." *J Immunol* **162**(9): 5317-26.
- Judge, A. D., X. Zhang, et al. (2002). "Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells." *J Exp Med* **196**(7): 935-46.
- Kaech, S. M., J. T. Tan, et al. (2003). "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells." *Nat Immunol* **4**(12): 1191-8.
- Kamimura, D., N. Ueda, et al. (2004). "Evidence of a novel IL-2/15R beta-targeted cytokine involved in homeostatic proliferation of memory CD8+ T cells." *J Immunol* **173**(10): 6041-9.
- Kappes, D. J. and X. He (2005). "CD4-CD8 lineage commitment: an inside view." *Nat Immunol* **6**(8): 761-6.
- Kasow, K. A., X. Chen, et al. (2004). "Human CD4+CD25+ regulatory T cells share equally complex and comparable repertoires with CD4+CD25- counterparts." *J Immunol* **172**(10): 6123-8.
- Kassiotis, G., S. Garcia, et al. (2002). "Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells." *Nat Immunol* **3**(3): 244-50.
- Kassiotis, G. and B. Stockinger (2004). "Anatomical heterogeneity of memory CD4+ T cells due to reversible adaptation to the microenvironment." *J Immunol* **173**(12): 7292-8.
- Kearse, K. P., J. L. Roberts, et al. (1994). "Developmental regulation of alpha beta T cell antigen receptor expression results from differential stability of nascent TCR alpha proteins within the endoplasmic reticulum of immature and mature T cells." *Embo J* **13**(19): 4504-14.
- Khattari, R., T. Cox, et al. (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." *Nat Immunol* **4**(4): 337-42.
- Khor, B. and B. P. Sleckman (2002). "Allelic exclusion at the TCRbeta locus." *Curr Opin Immunol* **14**(2): 230-4.
- Kieper, W. C. and S. C. Jameson (1999). "Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13306-11.
- Kieper, W. C., J. T. Tan, et al. (2002). "Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells." *J Exp Med* **195**(12): 1533-9.
- Kieper, W. C., A. Troy, et al. (2005). "Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion." *J Immunol* **174**(6): 3158-63.
- Kimura, K., H. Matsubara, et al. (1991). "Role of glycosaminoglycans in the regulation of T cell proliferation induced by thymic stroma-derived T cell growth factor." *J Immunol* **146**(8): 2618-24.
- King, C., A. Ilic, et al. (2004). "Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity." *Cell* **117**(2): 265-77.
- Kinter, A. L., M. Hennessey, et al. (2004). "CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status." *J Exp Med* **200**(3): 331-43.
- Kirberg, J., H. von Boehmer, et al. (2001). "Class II essential for CD4 survival." *Nat Immunol* **2**(2): 136-7.
- Koller, B. H., P. Marrack, et al. (1990). "Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells." *Science* **248**(4960): 1227-30.
- Kondrack, R. M., J. Harbertson, et al. (2003). "Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells." *J Exp Med* **198**(12): 1797-806.
- Jerne, N. K. (1973). "The immune system." *Sci Am* **229**(1): 52-60.
- Jiang, Q., W. Q. Li, et al. (2004). "Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members." *Mol Cell Biol* **24**(14): 6501-13.
- Jordan, M. S., A. Boesteanu, et al. (2001). "Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide." *Nat Immunol* **2**(4): 301-6.

## J-K

- Kovanen, P. E. and W. J. Leonard (2004). "Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways." *Immunol Rev* **202**: 67-83.
- Krangel, M. S. (2003). "Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond." *Nat Immunol* **4**(7): 624-30.
- Kroemer, R. T., S. W. Doughty, et al. (1996). "Prediction of the three-dimensional structure of human interleukin-7 by homology modeling." *Protein Eng* **9**(6): 493-8.
- Kronenberg, M. and A. Rudensky (2005). "Regulation of immunity by self-reactive T cells." *Nature* **435**(7042): 598-604.
- Krotkova, A., H. von Boehmer, et al. (1997). "Allelic exclusion in pTalpha-deficient mice: no evidence for cell surface expression of two T cell receptor (TCR)-beta chains, but less efficient inhibition of endogenous Vbeta--> (D)Jbeta rearrangements in the presence of a functional TCR-beta transgene." *J Exp Med* **186**(5): 767-75.

## L

- La Gruta, N. L., I. R. Driel, et al. (2000). "Peripheral T cell expansion in lymphopenic mice results in a restricted T cell repertoire." *Eur J Immunol* **30**(12): 3380-6.
- Labrecque, N., L. S. Whitfield, et al. (2001). "How much TCR does a T cell need?" *Immunity* **15**(1): 71-82.
- Laky, K. and B. J. Fowlkes (2005). "Receptor signals and nuclear events in CD4 and CD8 T cell lineage commitment." *Curr Opin Immunol* **17**(2): 116-21.
- Lantz, O., I. Grandjean, et al. (2000). "Gamma chain required for naive CD4+ T cell survival but not for antigen proliferation." *Nat Immunol* **1**(1): 54-8.
- Lee, G., A. E. Namen, et al. (1988). "Recombinant interleukin-7 supports the growth of normal B lymphocyte precursors." *Curr Top Microbiol Immunol* **141**: 16-8.
- Lee, H. C., H. Shibata, et al. (2005). "Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor alpha promoter by glucocorticoid receptor." *J Immunol* **174**(12): 7800-6.
- Lenz, D. C., S. K. Kurz, et al. (2004). "IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(25): 9357-62.
- Li, J., G. Huston, et al. (2003). "IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells." *J Exp Med* **198**(12): 1807-15.
- Li, W. Q., Q. Jiang, et al. (2004). "Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival." *J Biol Chem* **279**(28): 29160-6.
- Linton, P. J. and K. Dorshkind (2004). "Age-related changes in lymphocyte development and function." *Nat Immunol* **5**(2): 133-9.
- Loder, F., B. Mutschler, et al. (1999). "B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals." *J Exp Med* **190**(1): 75-89.
- Lotteau, V., L. Teyton, et al. (1990). "Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain." *Nature* **348**(6302): 600-5.
- Lucas, B., F. Vasseur, et al. (1995). "Stochastic coreceptor shut-off is restricted to the CD4 lineage maturation pathway." *J Exp Med* **181**(5): 1623-33.
- Lupton, S. D., S. Gimpel, et al. (1990). "Characterization of the human and murine IL-7 genes." *J Immunol* **144**(9): 3592-601.
- Lyons, A. B. and C. R. Parish (1994). "Determination of lymphocyte division by flow cytometry." *J Immunol Methods* **171**(1): 131-7.
- Mackall, C. L., C. V. Bare, et al. (1996). "Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing." *J Immunol* **156**(12): 4609-16.
- Malek, T. R. (2003). "The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells." *J Leukoc Biol* **74**(6): 961-5.
- Malek, T. R. and A. L. Bayer (2004). "Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2." *Nat Rev Immunol* **4**(9): 665-74.
- Malissen, M., A. Gillet, et al. (1995). "Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene." *Embo J* **14**(19): 4641-53.
- Mancini, S. J., S. M. Candeias, et al. (2001). "TCRA gene rearrangement in immature thymocytes in absence of CD3, pre-TCR, and TCR signaling." *J Immunol* **167**(8): 4485-93.
- Mandal, M., C. Borowski, et al. (2005). "The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival." *J Exp Med* **201**(4): 603-14.
- Maraskovsky, E., L. A. O'Reilly, et al. (1997). "Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1/- mice." *Cell* **89**(7): 1011-9.
- Marleau, A. M. and N. Sarvetnick (2005). "T cell homeostasis in tolerance and immunity." *J Leukoc Biol* **78**(3): 575-84.
- Martin, C. H., I. Aifantis, et al. (2003). "Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential." *Nat Immunol* **4**(9): 866-73.
- Martin, F. and J. F. Kearney (2002). "Marginal-zone B cells." *Nat Rev Immunol* **2**(5): 323-35.
- Matsuda, J. L., L. Gapin, et al. (2002). "Homeostasis of V alpha 14i NKT cells." *Nat Immunol* **3**(10): 966-74.
- Matzinger, P. and M. J. Bevan (1977). "Induction of H-2-restricted cytotoxic T cells: in vivo induction has the appearance of being unrestricted." *Cell Immunol* **33**(1): 92-100.
- Mazmanian, S. K., C. H. Liu, et al. (2005). "An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system." *Cell* **122**(1): 107-18.
- Melchers, F. (2005). "The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire." *Nat Rev Immunol* **5**(7): 578-84.
- Mertsching, E., C. Burdet, et al. (1995). "IL-7 transgenic mice: analysis of the role of IL-7 in the differentiation of thymocytes in vivo and in vitro." *Int Immunol* **7**(3): 401-14.
- Mertsching, E., U. Grawunder, et al. (1996). "Phenotypic and functional analysis of B lymphopoiesis in interleukin-7-transgenic mice: expansion of pro/pre-B cell number and persistence of B lymphocyte development in lymph nodes and spleen." *Eur J Immunol* **26**(1): 28-33.
- Metcalf, D. (1960). "The effect of thymectomy on the lymphoid tissues of the mouse." *Br J Haematol* **6**: 324-33.
- Michie, A. M., J. R. Carlyle, et al. (1998). "Early intrathymic precursor cells acquire a CD4(low) phenotype." *J Immunol* **160**(4): 1735-41.
- Michie, A. M. and J. C. Zuniga-Pflucker (2002). "Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection." *Semin Immunol* **14**(5): 311-23.
- Miller, J. F. (1961). "Immunological function of the thymus." *Lancet* **2**: 748-9.

- Miller, J. F. (1979). "Experimental thymology has come of age." *Thymus* **1**(1-2): 3-25.
- Min, B., R. McHugh, et al. (2003). "Neonates support lymphopenia-induced proliferation." *Immunity* **18**(1): 131-40.
- Min, B., H. Yamane, et al. (2005). "Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms." *J Immunol* **174**(10): 6039-44.
- Mombaerts, P., A. R. Clarke, et al. (1992). "Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages." *Nature* **360**(6401): 225-31.
- Moore, T. A. and A. Zlotnik (1995). "T-cell lineage commitment and cytokine responses of thymic progenitors." *Blood* **86**(5): 1850-60.
- Moratz, C., K. Harrison, et al. (2004). "Regulation of chemokine-induced lymphocyte migration by RGS proteins." *Methods Enzymol* **389**: 15-32.
- Moratz, C., J. R. Hayman, et al. (2004). "Abnormal B-cell responses to chemokines, disturbed plasma cell localization, and distorted immune tissue architecture in Rgs1-/- mice." *Mol Cell Biol* **24**(13): 5767-75.
- Moratz, C., V. H. Kang, et al. (2000). "Regulator of G protein signaling 1 (RGS1) markedly impairs Gi alpha signaling responses of B lymphocytes." *J Immunol* **164**(4): 1829-38.
- Moroy, T. (2005). "The zinc finger transcription factor Growth factor independence 1 (Gfi1)." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(3): 541-6.
- Morrissey, P. J., P. Conlon, et al. (1991). "Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation." *J Immunol* **146**(5): 1547-52.
- Moser, B., M. Wolf, et al. (2004). "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control." *Trends Immunol* **25**(2): 75-84.
- Mottet, C., H. H. Uhlig, et al. (2003). "Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* **170**(8): 3939-43.
- Muegge, K., H. Young, et al. (2003). "Epigenetic control during lymphoid development and immune responses: aberrant regulation, viruses, and cancer." *Ann N Y Acad Sci* **983**: 55-70.
- Munitic, I., J. A. Williams, et al. (2004). "Dynamic regulation of IL-7 receptor expression is required for normal thymopoiesis." *Blood* **104**(13): 4165-72.
- Murakami, M., A. Sakamoto, et al. (2002). "CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13): 8832-7.
- Murali-Krishna, K. and R. Ahmed (2000). "Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells." *J Immunol* **165**(4): 1733-7.
- Murali-Krishna, K., L. L. Lau, et al. (1999). "Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice." *Science* **286**(5443): 1377-81.

## N-O

- Nabarra, B., C. Martinon, et al. (2002). "Early steps of a thymic tumor in SV40 transgenic mice: hyperplasia of medullary epithelial cells and increased mature thymocyte numbers disturb thymic export." *Dev Immunol* **9**(4): 223-31.
- Namen, A. E., S. Lupton, et al. (1988). "Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7." *Nature* **333**(6173): 571-3.
- Napolitano, L. A., R. M. Grant, et al. (2001). "Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-

cell depletion: implications for T-cell homeostasis." *Nat Med* **7**(1): 73-9.

- Niederberger, N., K. Holmberg, et al. (2003). "Allelic exclusion of the TCR alpha-chain is an active process requiring TCR-mediated signaling and c-Cbl." *J Immunol* **170**(9): 4557-63.
- Nikolic-Zugic, J. and M. J. Bevan (1990). "Role of self-peptides in positively selecting the T-cell repertoire." *Nature* **344**(6261): 65-7.
- Oliveira-Dos-Santos, A. J., G. Matsumoto, et al. (2000). "Regulation of T cell activation, anxiety, and male aggression by RGS2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22): 12272-7.
- O'Reilly, L. A., A. W. Harris, et al. (1997). "bcl-2 transgene expression promotes survival and reduces proliferation of CD3-CD4-CD8- T cell progenitors." *Int Immunol* **9**(9): 1291-301.

## P-R

- Padovan, E., G. Casorati, et al. (1995). "Dual receptor T-cells. Implications for alloreactivity and autoimmunity." *Ann N Y Acad Sci* **756**: 66-70.
- Padovan, E., G. Casorati, et al. (1993). "Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells." *Science* **262**(5132): 422-4.
- Padovan, E., C. Giachino, et al. (1995). "Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor beta chains: implications for the mechanism of allelic exclusion." *J Exp Med* **181**(4): 1587-91.
- Palmer, E. (2003). "Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire." *Nat Rev Immunol* **3**(5): 383-91.
- Park, J. H., Q. Yu, et al. (2004). "Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival." *Immunity* **21**(2): 289-302.
- Pasqual, N., M. Gallagher, et al. (2002). "Quantitative and qualitative changes in V-J alpha rearrangements during mouse thymocytes differentiation: implication for a limited T cell receptor alpha chain repertoire." *J Exp Med* **196**(9): 1163-73.
- Pelayo, R., R. Welner, et al. (2005). "Lymphoid progenitors and primary routes to becoming cells of the immune system." *Curr Opin Immunol* **17**(2): 100-7.
- Perarnau, B., C. A. Siegrist, et al. (1990). "Beta 2-microglobulin restriction of antigen presentation." *Nature* **346**(6286): 751-4.
- Peschon, J. J., P. J. Morrissey, et al. (1994). "Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice." *J Exp Med* **180**(5): 1955-60.
- Petrie, H. T., F. Livak, et al. (1993). "Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes." *J Exp Med* **178**(2): 615-22.
- Phillips, J. A., T. I. Brondstetter, et al. (2004). "IL-7 gene therapy in aging restores early thymopoiesis without reversing involution." *J Immunol* **173**(8): 4867-74.
- Podack, E. R. and A. Kupfer (1991). "T-cell effector functions: mechanisms for delivery of cytotoxicity and help." *Annu Rev Cell Biol* **7**: 479-504.
- Polic, B., D. Kunkel, et al. (2001). "How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15): 8744-9.
- Porritt, H. E., L. L. Rumfelt, et al. (2004). "Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages." *Immunity* **20**(6): 735-45.

- Prockop, S. and H. T. Petrie (2000). "Cell migration and the anatomic control of thymocyte precursor differentiation." *Semin Immunol* **12**(5): 435-44.
- Puel, A., S. F. Ziegler, et al. (1998). "Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency." *Nat Genet* **20**(4): 394-7.
- Punt, J. A., J. L. Roberts, et al. (1994). "Stoichiometry of the T cell antigen receptor (TCR) complex: each TCR/CD3 complex contains one TCR alpha, one TCR beta, and two CD3 epsilon chains." *J Exp Med* **180**(2): 587-93.
- Rakesh, K. and D. K. Agrawal (2005). "Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors." *Biochem Pharmacol* **70**(5): 649-57.
- Reif, K. and J. G. Cyster (2000). "RGS molecule expression in murine B lymphocytes and ability to down-regulate chemotaxis to lymphoid chemokines." *J Immunol* **164**(9): 4720-9.
- Riberdy, J. M., J. R. Newcomb, et al. (1992). "HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides." *Nature* **360**(6403): 474-7.
- Rolink, A. G., E. ten Boekel, et al. (1999). "B cell development in the mouse from early progenitors to mature B cells." *Immunol Lett* **68**(1): 89-93.
- Sakaguchi, S. (2002). "Immunologic tolerance maintained by regulatory T cells: implications for autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance." *Vox Sang* **83 Suppl 1**: 151-3.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." *Annu Rev Immunol* **22**: 531-62.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-64.
- Sarafova, S. D., B. Erman, et al. (2005). "Modulation of coreceptor transcription during positive selection dictates lineage fate independently of TCR/coreceptor specificity." *Immunity* **23**(1): 75-87.
- Schluns, K. S., W. C. Kieper, et al. (2000). "Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo." *Nat Immunol* **1**(5): 426-32.
- Schmitt, T. M., M. Ciofani, et al. (2004). "Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions." *J Exp Med* **200**(4): 469-79.
- Schmitt, T. M. and J. C. Zuniga-Pflucker (2002). "Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro." *Immunity* **17**(6): 749-56.
- Schuler, T., G. J. Hammerling, et al. (2004). "Cutting edge: IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD8+ T cells in neonatal mice allows the generation of long-lived natural memory T cells." *J Immunol* **172**(1): 15-9.
- Scollay, R. and I. L. Weissman (1980). "T cell maturation: thymocyte and thymus migrant subpopulations defined with monoclonal antibodies to the antigens Lyt-1, Lyt-2, and ThB1." *J Immunol* **124**(6): 2841-4.
- Scollay, R. G., E. C. Butcher, et al. (1980). "Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice." *Eur J Immunol* **10**(3): 210-8.
- Seddon, B., P. Tomlinson, et al. (2003). "Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells." *Nat Immunol* **4**(7): 680-6.
- Seddon, B. and R. Zamoyska (2002). "TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naive T cells." *J Immunol* **169**(7): 3752-9.
- Seder, R. A. and R. Ahmed (2003). "Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation." *Nat Immunol* **4**(9): 835-42.
- Setoguchi, R., S. Hori, et al. (2005). "Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization." *J Exp Med* **201**(5): 723-35.
- Sette, A., S. Ceman, et al. (1992). "Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant." *Science* **258**(5089): 1801-4.
- Sha, W. C., C. A. Nelson, et al. (1988). "Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice." *Nature* **336**(6194): 73-6.
- Sha, W. C., C. A. Nelson, et al. (1988). "Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice." *Nature* **335**(6187): 271-4.
- Sha, W. C., C. A. Nelson, et al. (1990). "Positive selection of transgenic receptor-bearing thymocytes by Kb antigen is altered by Kb mutations that involve peptide binding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(16): 6186-90.
- Shevach, E. M. (2002). "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." *Nat Rev Immunol* **2**(6): 389-400.
- Shinkai, Y., S. Koyasu, et al. (1993). "Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes." *Science* **259**(5096): 822-5.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, et al. (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." *Cell* **68**(5): 855-67.
- Simpson, E., K. Takacs, et al. (1994). "Thymic repertoire selection by superantigens: presentation by human and mouse MHC molecules." *Thymus* **23**(1): 1-13.
- Singer, A. and R. Bosselut (2004). "CD4/CD8 coreceptors in thymocyte development, selection, and lineage commitment: analysis of the CD4/CD8 lineage decision." *Adv Immunol* **83**: 91-131.
- Starr, R. and D. J. Hilton (1998). "SOCs: suppressors of cytokine signalling." *Int J Biochem Cell Biol* **30**(10): 1081-5.
- Starr, T. K., S. C. Jameson, et al. (2003). "Positive and negative selection of T cells." *Annu Rev Immunol* **21**: 139-76.
- Stockinger, B., T. Barthlott, et al. (2004). "The concept of space and competition in immune regulation." *Immunology* **111**(3): 241-7.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, et al. (1998). "CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells." *J Immunol* **160**(3): 1212-8.
- Sutherland, J. S., G. L. Goldberg, et al. (2005). "Activation of thymic regeneration in mice and humans following androgen blockade." *J Immunol* **175**(4): 2741-53.
- Suzuki, H., J. A. Punt, et al. (1995). "Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4+ versus CD8+ T cell lineages: a new perspective on thymic commitment and selection." *Immunity* **2**(4): 413-25.
- Swain, S. L., H. Hu, et al. (1999). "Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors." *Science* **286**(5443): 1381-3.

- Taams, L. S. and A. N. Akbar (2005). "Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Curr Top Microbiol Immunol* **293**: 115-31.
- Taams, L. S., J. Smith, et al. (2001). "Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population." *Eur J Immunol* **31**(4): 1122-31.
- Tan, J. T., E. Dudl, et al. (2001). "IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15): 8732-7.
- Tan, J. T., B. Ernst, et al. (2002). "Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells." *J Exp Med* **195**(12): 1523-32.
- Tanchot, C., A. Le Champion, et al. (2002). "Conversion of naive T cells to a memory-like phenotype in lymphopenic hosts is not related to a homeostatic mechanism that fills the peripheral naive T cell pool." *J Immunol* **168**(10): 5042-6.
- Tanchot, C., F. A. Lemonnier, et al. (1997). "Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells." *Science* **276**(5321): 2057-62.
- Tanchot, C., M. M. Rosado, et al. (1997). "Lymphocyte homeostasis." *Semin Immunol* **9**(6): 331-7.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, et al. (2004). "In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes." *J Exp Med* **199**(11): 1455-65.
- Tarbell, K. V., S. Yamazaki, et al. (2004). "CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes." *J Exp Med* **199**(11): 1467-77.
- Teyton, L., D. O'Sullivan, et al. (1990). "Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways." *Nature* **348**(6296): 39-44.
- Theofilopoulos, A. N., W. Dummer, et al. (2001). "T cell homeostasis and systemic autoimmunity." *J Clin Invest* **108**(3): 335-40.
- Thoman, M. L. (1997). "Early steps in T cell development are affected by aging." *Cell Immunol* **178**(2): 117-23.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." *J Immunol* **164**(1): 183-90.
- Ting, J. P. and A. S. Baldwin (1993). "Regulation of MHC gene expression." *Curr Opin Immunol* **5**(1): 8-16.
- Tough, D. F. and J. Sprent (1994). "Turnover of naive- and memory-phenotype T cells." *J Exp Med* **179**(4): 1127-35.
- Tough, D. F., S. Sun, et al. (1997). "T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS)." *J Exp Med* **185**(12): 2089-94.
- Tourigny, M. R., S. Mazel, et al. (1997). "T cell receptor (TCR)-beta gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny." *J Exp Med* **185**(9): 1549-56.
- Traggiai, E., L. Chicha, et al. (2004). "Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice." *Science* **304**(5667): 104-7.
- van Ewijk, W., G. Hollander, et al. (2000). "Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets." *Development* **127**(8): 1583-91.
- van Santen, H. M., C. Benoist, et al. (2004). "Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells." *J Exp Med* **200**(10): 1221-30.
- Veiga-Fernandes, H. and B. Rocha (2004). "High expression of active CDK6 in the cytoplasm of CD8 memory cells favors rapid division." *Nat Immunol* **5**(1): 31-7.
- Vicart, P., B. Schwartz, et al. (1994). "Immortalization of multiple cell types from transgenic mice using a transgene containing the vimentin promoter and a conditional oncogene." *Exp Cell Res* **214**(1): 35-45.
- Viret, C., F. S. Wong, et al. (1999). "Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition." *Immunity* **10**(5): 559-68.
- von Boehmer, H. (2005). "Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate." *Nat Rev Immunol* **5**(7): 571-7.
- von Freeden-Jeffry, U., P. Vieira, et al. (1995). "Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine." *J Exp Med* **181**(4): 1519-26.

## W-Z

- Wallis, V. J., E. Leuchars, et al. (1979). "Studies on hyperlymphoid mice." *Immunology* **38**(1): 163-71.
- Weiss, L., V. Donkova-Petrini, et al. (2004). "Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients." *Blood* **104**(10): 3249-56.
- Werlen, G., B. Hausmann, et al. (2003). "Signaling life and death in the thymus: timing is everything." *Science* **299**(5614): 1859-63.
- Wicker, L. S. (1997). "Major histocompatibility complex-linked control of autoimmunity." *J Exp Med* **186**(7): 973-5.
- Wilson, A., W. Held, et al. (1994). "Two waves of recombination gene expression in developing thymocytes." *J Exp Med* **179**(4): 1355-60.
- Wilson, A. and H. R. MacDonald (1995). "Expression of genes encoding the pre-TCR and CD3 complex during thymus development." *Int Immunol* **7**(10): 1659-64.
- Wilson, A., C. Marechal, et al. (2001). "Biased V beta usage in immature thymocytes is independent of DJ beta proximity and pT alpha pairing." *J Immunol* **166**(1): 51-7.
- Woo, E. Y., H. Yeh, et al. (2002). "Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation." *J Immunol* **168**(9): 4272-6.
- Wu, L., C. L. Li, et al. (1996). "Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny." *J Exp Med* **184**(3): 903-11.
- Wu, L., R. Scollay, et al. (1991). "CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus." *Nature* **349**(6304): 71-4.
- Xue, H. H., J. Bollenbacher, et al. (2004). "GA binding protein regulates interleukin 7 receptor alpha-chain gene expression in T cells." *Nat Immunol* **5**(10): 1036-44.
- Xue, H. H., P. E. Kovanen, et al. (2002). "IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13759-64.
- Yu, Q., B. Erman, et al. (2003). "In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells." *J Exp Med* **197**(4): 475-87.
- Yu, Q., B. Erman, et al. (2004). "IL-7 receptor signals inhibit expression of transcription factors TCF-1, LEF-1, and RORgamma: impact on thymocyte development." *J Exp Med* **200**(6): 797-803.
- Zandman-Goddard, G. and Y. Shoenfeld (2002). "HIV and autoimmunity." *Autoimmun Rev* **1**(6): 329-37.



- Zhang, X., S. Sun, et al. (1998). "Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15." Immunity **8**(5): 591-9.
- Zinkernagel, R. M. (1978). "Thymus and lymphohemopoietic cells: their role in T cell maturation in selection of T cells' H-2-restriction-specificity and in H-2 linked Ir gene control." Immunol Rev **42**: 224-70.



# Table des illustrations

## Chapitre 1 : Introduction

**Figure 1.1 (page 13)** : Représentation schématique des complexes TCR/CMH-pAg sur les CPA.  
**Figure 1.2 (page 18)** : Localisation et organisation histologique du thymus.  
**Figure 1.3 (page 30)** : Dissection géographique et fonctionnelle du modèle cinétique.  
**Figure 1.4 (page 33)** : Représentation schématique des récepteurs à l'IL-7 et 15.  
**Figure 1.5 (page 37)** : Voie de signalisation IL-7 dépendante impliquée dans la prolifération des LyT.  
**Figure 1.6 (page 38)** : Voie de signalisation IL-7 dépendante impliquée dans la survie des LyT.  
**Figure 1.7 (page 41)** : Expression de l'IL-7 et cellules IL-7R $\alpha^+$  au niveau du thymus.

**Tableau 1.1 (page 27)** : Mise en évidence du rôle du thymus dans la sélection (expériences de Bevan).  
**Tableau 1.2 (page 37)** : Principales cytokines impliquées dans l'homéostasie des lymphocytes.  
**Tableau 1.3 (page 48)** : Propriétés phénotypiques des LyT naïfs, mémoires ou régulateurs.

## Chapitre 2 : Résultats

**Figure 2.1 (page 70)** : Carte schématique du plasmide pDOI-IL-7 et du transgène résultant.  
**Figure 2.2 (page 72)** : Méthode d'analyse des thymocytes DN.  
**Figure 2.3 (page 73)** : Photographie des organes lymphoïdes des souris contrôles *versus* VT4.  
**Figure 2.4 (page 74)** : Analyse du niveau d'expression intracellulaire de Bcl-2 dans les DN.  
**Figure 2.5 (page 75)** : Analyse du niveau d'expression intracellulaire de Bcl-2 dans les thymocytes.  
**Figure 2.6 (page 75)** : Analyse du niveau d'expression intracellulaire de Bcl-2 dans les splénocytes.  
**Figure 2.7 (page 80)** : Schéma de différenciation des lymphocytes B.  
**Figure 2.8 (page 81)** : Analyse par microscopie confocale des follicules lymphoïdes de la rate.  
**Figure 2.9 (page 86)** : Principe et méthodologie de la PCR multiplexe.  
**Figure 2.10 (page 88)** : Représentation schématique d'une parabiose de souris.  
**Figure 2.11 (page 99)** : Thymopoïèse et lymphopoïèse chez les souris contrôles *versus* pT $\alpha^{-/-}$ .  
**Figure 2.12 (page 100)** : Phénotype des splénocytes CD4 $^+$  ou CD8 $^+$  chez les souris contrôles *versus* pT $\alpha^{-/-}$ .  
**Figure 2.13 (page 100)** : Expression de cytokine après activation in vitro par les splénocytes des souris contrôles *versus* pT $\alpha^{-/-}$ .  
**Figure 2.14 (page 101)** : Réponse immune T-dépendante chez les souris contrôles *versus* pT $\alpha^{-/-}$ .  
**Figure 2.15 (page 102)** : Enrichissement en Treg dans les organes lymphoïdes des souris pT $\alpha^{-/-}$ .  
**Figure 2.16 (page 103)** : Représentation schématique des chimères de moelles osseuses réalisées.  
**Figure 2.17 (page 104)** : Analyse représentative des chimères de moelles osseuses réalisées.  
**Figure 2.18 (page 105)** : Niveau d'expression de Ki-67 en fonction du nombre de splénocytes total dans une rate.  
**Figure 2.19 (page 106)** : La lymphopénie entraîne une expansion relative des LyT CD4 $^+$ CD25 $^+$ .

**Tableau 2.1 (page 79)** : Phénotype et localisation des populations de lymphocytes B de la rate.

## Chapitre 3 : Discussion et perspectives

**Figure 3.1 (page 111)** : Activité de prolifération, niveau d'expression de l'IL-7R et de Bcl-2 au cours de la thymopoïèse : une synthèse.  
**Figure 3.2 (page 116)** : Sélection centrale *versus* « sélection périphérique », même but mais des moyens différents.  
**Figure 3.3 (page 121)** : Proposition expérimentale pour tester l'importance des DC dans l'homéostasie des LyT.

# Résumé

Plusieurs paramètres participent à l'homéostasie du système immunitaire. On peut notamment citer : la production lymphocytaire (les lymphocytes B dans la moelle osseuse ou les lymphocytes T (LyT) dans le thymus), la prolifération et la survie des lymphocytes périphériques et enfin, la compétition entre les différents clones de lymphocytes ou les différentes populations de lymphocytes pour des ressources limitées en particulier les cytokines. Les mécanismes de régulation homéostatique sont différents selon la sous-population de lymphocyte considérée. Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié le rôle de l'interleukine-7 (IL-7) dans l'homéostasie des lymphocytes et plus particulièrement les lymphocytes T  $\alpha\beta$ . Disposant de souris surexprimant l'IL-7 dans un état lymphopénique plus ou moins sévère, nous avons pu décortiquer les effets de l'IL-7 sur le développement précoce des LyT et leur survie périphérique. L'analyse du développement précoce des lymphocytes n'a pas révélé d'effet notable de la sur-expression de l'IL-7 sur le développement thymique des LyT. En revanche, une expansion considérable des LyT périphériques a été observée. A partir d'expérience de transferts adoptifs, nous avons montré que l'IL-7 favorisait la prolifération et la survie des LyT périphériques. La quantité d'IL-7 disponible module donc le devenir des LyT présents dans les organes lymphoïdes lors d'un épisode lymphopénique.